ORSAY
Série A, N° 36
N° d'ordre

T H E S E S

p r é s e n t é e s

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université

(mention Sciences)

p a r

Madame Anne FOURCADE

née DARSKY

Ière Thèse : Recherches sur la catalase en relation avec les Mitochondries et la cancérisation.

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenue le 19 décembre 1966 devant la Commission d'Examen

Mr TONNELAT : Président

Mr VILKAS)
Mr VIGNAIS) Examinateurs
Mr ROSENBERG)

Au Dr Jacques Mawas
hommage respectueux
Annette

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université

(mention Sciences)

par

Madame Anne FOURCADE

née DARSKY

Ière Thèse : Recherches sur la catalase en relation avec les Mitochondries et la cancérisation.

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenue le 19 décembre 1966 devant la Commission d'Examen

Mr TONNELAT : Président

Mr VILKAS)
Mr VIGNAIS) Examinateurs
Mr ROSENBERG)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

à F. F.

A Monsieur le Professeur ROSENBERG qui m'a orientée vers l'étude de la catalase et qui m'a donné les moyens de réaliser ce travail, j'exprime ma vive reconnaissance.

Que Monsieur le Professeur TONNELAT, qui a bien voulu être le Directeur de cette thèse et qui m'a toujours assurée de son appui et de ses conseils, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur VIGNAIS, qui m'a aidée à interpréter et achever ce travail, et qui m'a donné son appui pour le mener à bonne fin.

Je remercie Monsieur le Professeur VILKAS qui a accepté de faire partie de mon Jury de soutenance de Thèse, et dont les critiques me serviront dans mon travail futur.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame KHOUVINE, Directeur de Recherches, qui m'a hébergée dans son service et qui, avec patience et efficacité, m'a aidée chaque fois que l'occasion s'en présentait.

Je ne dirai jamais assez ce que je dois à Mademoiselle GUINAND, Maître de Recherches, qui m'a toujours encouragée, appuyée et aidée et qui a eu la patience de vérifier la rédaction de ce travail.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549020_0011

Je remercie de tout coeur mon ami M. SZAFARZ, Maître de Recherches qui, avec un parfait désintéressement, a toujours su être présent lorsqu'une difficulté se manifestait, et qui m'a aidée à assurer la présentation de ce travail.

Je remercie Madame PREVOST, Chef de Travaux, qui s'est si aimablement chargée de procéder aux examens de microscopie électronique, en dépit des tâches multiples qu'elle avait déjà à assumer.

Que Madame RAVICOVITCH, chargée de Recherches, sur l'amitié de laquelle j'ai toujours pu compter, trouve ici l'expression de ma reconnaissance émue.

Je remercie Mademoiselle RUET qui m'a donné une efficace et solide collaboration technique avec une amitié et un dévouement à toute épreuve, et aussi Mademoiselle F. ISAMBERT qui m'a si gentiment aidée à terminer mes dernières expériences.

A tous les collaborateurs de Monsieur ROSENBERG et de Madame KHOUVINE, j'exprime ma gratitude pour l'ambiance vivante et sympathique dans laquelle ce travail a été réalisé.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION GENERALE ____ 2

PREMIERE PARTIE

CARACTERISATION DE DEUX CLASSES DE MITOCHONDRIES EN RELATION AVEC LES REACTIONS DE L'OXYDATION PHOSPHORYLANTE ET LEURS PROPRIETES MEMBRANAIRES ____ 6

INTRODUCTION ____ 7

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES ____ 13

I - Différentes techniques de préparation des mitochondries ____ 13

1) Première méthode de séparation des particules ____ 13

2) Mise au point d'une technique de préparation de deux populations mitochondriales distinctes ____ 15

3) Purification des deux populations mitochondriales ____ 18

4) Préparation des mitochondries à partir de cellules d'ascite ____ 21

5) Préparation des mitochondries débarrassées de leur cytochrome c endogène ____ 23

II - Détermination des oxydations phosphorylantes ____ 23

1) Préparation des suspensions de mitochondries ____ 24

2) Milieu réactionnel ____ 24

3) Mode opératoire ____ 26

III - Détermination de la teneur en eau 28

Description de la méthode 28

- Première Technique 29

- Deuxième Technique : détermination de la radioactivité fixée par les mitochondries 30

IV - Etude du Gonflement des particules 31

1) Mode opératoire 32

2) Préparation des agents de gonflement 33

CHAPITRE II : OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES ET PROPRIETES MEMBRANAIRES 34

I - Oxydations phosphorylantes 34

1) Oxydations phosphorylantes des mitochondries M et G dans une solution de KREBS-RINGER 34

2) Oxydations phosphorylantes des mitochondries M et G préparées dans une solution de saccharose isotonique et centrifugées à 26.000 g 37

3) Oxydations phosphorylantes des mitochondries purifiées 39

4) Oxydations phosphorylantes des mitochondries M et G après une désintégration de la cellule hépatique au moyen du broyeur de Potter 41

5) Oxydations phosphorylantes des mitochondries préparées dans une solution de saccharose hypertonique 42

6) Oxydations phosphorylantes des mitochondries de cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA 43

7) Oxydations phosphorylantes de mitochondries débarrassées de leur cytochrome c endogène 44

II - Teneur en eau des mitochondries 45

1) Expériences préliminaires 46

2) Teneur en eau 46

3) Pénétration partielle des mitochondries par le saccharose 49

4) Tassement des Particules 50

III - Réaction de gonflement des deux populations mitochondriales 51

1) Gonflement induit par la Thyroxine 52

2) Gonflement induit par l'insuline 53

3) Gonflement induit par le Glutathion 54

4) Conclusion 54

DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE 55

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LA CATALASE 59

INTRODUCTION 60

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES 68

I - Dosage de la catalase 68

1) Dosage de l'eau oxygénée 68

A - Dosage spectrophotométrique 68

B - Dosage titrimétrique 69

2) Détermination de l'activité catalasique 69

1 - Activité catalasique de coupes de foie de rat 69

2 - Deuxième méthode de détermination de l'activité catalasique 70

3 - Etalonnage de la catalase 71

II - Différents traitements subis par les animaux 71

III - Préparation du matériel biologique 74

1) Préparation des coupes 74

2) Préparation d'homogénats entiers 74

3) Séparation des différentes fractions cellulaires ... 75

a) Préparation des différentes fractions pour le dosage de la catalase ... 76

b) Fractions M et G ... 77

c) Fraction S ... 78

CHAPITRE II : ETUDE DE L'ACTIVITE CATALASIQUE D'UN FOIE DE RAT NORMAL ET SOUMIS A DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES ... 80

I - Vitesse de la réaction catalasique étudiée sur des coupes de foie de rat ... 80

II - Etude de la catalase hépatique dans différentes conditions expérimentales ... 82

1) Activité d'homogénats différemment traités ... 82

2) Comparaison entre l'activité de coupes et d'homogénats entiers ... 84

3) Diffusion de la catalase ... 85

III - Etude de la distribution intracellulaire de la catalase dans le foie d'un rat normal ... 86

1) Teneur du foie en catalase ... 86

2) Distribution de la catalase entre les différentes fractions cellulaires ... 87

3) Concentration de la catalase dans les mitochondries et dans le cytoplasme ... 89

IV - Epuisement de la catalase des mitochondries ... 91

Discussions et conclusions du Chapitre II ... 94

CHAPITRE III : EVOLUTION DE LA CATALASE AU COURS DE LA CANCERISATION INDUITE PAR LA DIETHYLNITROSAMINE ... 96

I - Evolution des rats et des foies au cours de la cancérisation ... 96

II - Evolution des différentes fractions cellulaires ... 99

III - Evolution de la catalase hépatique 102
1) Catalase totale 102
2) Catalase cytoplasmique 102
3) Catalase des autres fractions 103

Discussions et conclusions du Chapitre III 106

CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALES 111

BIBLIOGRAPHIE 120

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Une caractéristique essentielle de la cellule cancéreuse est une capacité particulière de multiplication et d'invasion (74). Le tissu tumoral présente un taux de mitoses très élevé, anarchique, paraissant donc échapper à une régulation normale. Cette aberration est génétiquement transmissible et l'on pense actuellement que la cellule tumorale contient des acides nucléiques spécifiques de la cancérisation, ceux-ci entraînant l'élaboration de protéines également spécifiques (23). Ces synthèses sont effectuées dans les microsomes mais dépendent des systèmes respiratoires et glycolytiques générateurs de l'énergie. Or, les enzymes glycolytiques sont présents dans le cytoplasme et les réactions terminales d'oxydation s'effectuent par les enzymes du cycle de Krebs et les transporteurs d'électrons présents dans les mitochondries. Une étude biochimique de tous les constituants cellulaires est donc indispensable pour connaître la cellule cancéreuse. Ces constituants sont d'ailleurs diversement perturbés au cours de la cancérisation.

De nombreux travaux ont eu pour but de trouver les caractères communs à des tumeurs issues de tissus différents, ils avaient abouti à la notion de dédifférenciation cellulaire (63). Ainsi, les variations existant entre les tissus tumoraux sont-elles le plus souvent très atténuées par rapport à celles qui apparaissent entre les tissus normalement différenciés dont ils proviennent. Les cellules tumorales tendent à perdre leurs caractéristiques fonctionnelles et leurs enzymes spécifiques (53). Ainsi, l'hépatome a perdu une fonction essentielle du foie : le stockage du glycogène, il est en outre incapable de métaboliser les acides gras (74).

Le foie de rat est un matériel de choix pour étudier les modifications provoquées par la cancérisation. A l'état normal, son taux de mitoses est très faible, mais, en cas de régénération, il est susceptible d'une multiplication cellulaire très grande (74) ; celle-ci, toutefois, reste contrôlée. Son étude permet donc d'intéressantes comparaisons entre ces deux formes de multiplication cellulaire, l'une normale, l'autre aberrante. De plus, il est relativement aisé de provoquer la cancérisation expérimentale de cet organe par des substances cancérigènes telles que les colorants azoïques.

Signalons l'importance de l'étude du stade précancéreux. Dans les cancérisations expérimentales, il s'écoule un temps de latence entre le début de l'action du cancérigène et la formation de la tumeur. Pendant ce temps de latence, les cellules ne se multiplient pas encore activement, pourtant elles sont déjà en voie de cancérisation. C'est à ce stade que se produisent les modifications irréversibles qui feront passer la cellule de l'état normal à l'état néoplasique. Une grande partie des résultats relatifs à la biochimie du cancer a donc été obtenue à partir du foie de rat expérimentalement cancérisé. En tenant compte du postulat de dédifférenciation, on a pu en tirer des conclusions générales relatives au métabolisme du tissu cancéreux, et en déduire un comportement propre à ce tissu.

Les résultats obtenus sont souvent contradictoires. Ainsi, suivant les auteurs, les oxydations phosphorylantes sont, soit anormales (40), soit inchangées (13). De même, on a relevé, soit une augmentation, soit une diminution des cytochromes et plus particulièrement du cytochrome c (26) et de certains enzymes, la phosphatase acide par exemple (11). Un dénominateur commun à toutes les tumeurs a toutefois été reconnu depuis longtemps : l'inhibition de l'EFFET PASTEUR, sauf dans le cas de tumeurs très différenciées (23 , 9) :

en présence d'oxygène, le tissu tumoral forme de l'acide lactique alors que le tissu normal n'en forme pas (118 , 120).

Au terme de la glycolyse, au niveau de l'acide pyruvique, une bifurcation métabolique est possible. Ce corps peut être soit réduit en acide lactique dans le cytoplasme, soit oxydé dans les mitochondries par les enzymes du cycle tricarboxylique. Or dans un tissu tumoral, les mitochondries semblent inaptes à effectuer cette oxydation (21). Néanmoins, elles paraissent pourvues de l'équipement enzymatique nécessaire (21). Ce fait peut être dû à une modification dans la perméabilité de leur membrane, modification perturbant la régulation métabolique de la cellule.

Or, on a déjà montré qu'une altération structurale des mitochondries se produisait aux premiers stades de la cancérisation : diminution de leur perméabilité à la thyroxine activée par le coenzyme-A (74), modification de leurs propriétés de gonflement (15) ; ARCOS a établi qu'une altération irréversible de certains sites de contrôle de la membrane mitochondriale entraînant la suppression de nombreuses voies métaboliques peut être responsable de la cancérisation (15). On a même pensé qu'une mutation des mitochondries serait à l'origine de la cancérisation. Cette explication, toutefois, n'a pas été retenue à cette époque (124).

Pour vérifier quelques unes de ces hypothèses, nous avons étudié certaines propriétés des mitochondries qui sont liées à l'état de leur membrane. Dans une première partie de ce travail, nous rendrons compte des résultats obtenus et nous montrerons comment il serait possible de suivre l'évolution des mitochondries au cours de la cancérisation, afin de vérifier si elles sont impliquées dans les lésions primaires, irréversibles, qui mènent à la formation d'une tumeur.

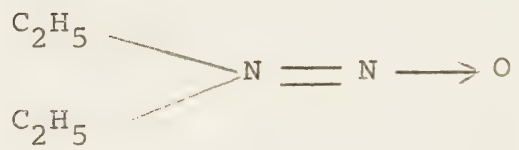
D'autre part, la cancérisation est accompagnée d'un phénomène assez remarquable : la disparition de la catalase hépatique. On sait, en effet, que le foie est très riche en catalase (45) et que cet enzyme disparaît avec le développement d'une tumeur, même lorsque celle-ci affecte un organe autre que le foie (53). Cette modification est réversible : dans les cas où il a été possible de supprimer la tumeur par extirpation, ou par amputation d'un membre atteint, le taux du foie en catalase est redevenu normal (53). Or on a trouvé récemment que la catalase s'avère être un très important facteur du maintien de la structure des mitochondries (94).

On a même proposé d'effectuer le dépistage du cancer en dosant la catalase hépatique (53). Toutefois, ces mêmes variations d'activité enzymatique ont aussi été observées au cours de différents états pathologiques. La diminution du taux de la catalase hépatique est plutôt un argument en faveur du diagnostic de néoplasie maligne.

Nous avons donc effectué des dosages systématiques de la catalase au cours de la cancérisation induite par un cancérigène nouveau, particulièrement efficace et préférentiel du foie : la diethyl-nitrosamine*. Dans la deuxième partie de ce travail, nous présenterons le résultat de nos investigations, et nous montrerons que l'évolution du taux de la catalase hépatique apporte des informations sur celle de l'état structural des mitochondries au cours de la cancérisation.

---

* la diéthylnitrosamine



P R E M I E R E P A R T I E

CARACTERISATION DE DEUX CLASSES DE MITOCHONDRIES EN RELATION AVEC LES REACTIONS DE L' OXYDATION PHOSPHORYLANTE ET LEURS PROPRIETES MEMBRANAIRES

I N T R O D U C T I O N

Les mitochondries produisent la plus grande partie de l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire. Elles sont localisées dans le cytoplasme, sous forme de particules sphériques ou allongées, dont le grand axe varie de 3 à 5 microns.

Leur taille et leur forme, qu'on peut observer au microscope électronique, dépendent des méthodes de fixation, du système optique utilisé, et varient suivant que les mitochondries sont observées in situ ou isolées, suivant le moment où le matériel est fixé et le type de cellules d'où elles proviennent. Les mitochondries de foie sont de forme et de taille moyennes.

Chaque particule mitochondriale est limitée par une double membrane de nature lipoprotéique. La membrane interne est invaginée en "cristae" et délimite une lumière centrale, la matrice. Celle-ci, de nature semi-fluide, contient des protéines et des lipides. La fixation à l'acide osmique met en évidence, dans la matrice, de petits granules qui varient en nombre et en dimension. Leur opacité aux électrons varie aussi suivant l'état métabolique du tissu.

Les mitochondries possèdent l'équipement enzymatique intervenant dans le cycle de Krebs, le cycle d'oxydation des acides gras et la formation des corps cétoniques. La plupart de ces enzymes sont localisés dans la matrice ; ainsi, par exemple, la ß-hydroxybutyrate déshydrogénase et la succino-déshydrogénase sont présentes dans les membranes. Celles-ci contiennent en particulier les transporteurs de la chaine respiratoire, associés en ensembles réguliers et transférant les électrons donnés par des métabolites primaires jusqu'à l'oxygène. Ce transfert, au moins au niveau de la

membrane interne, est étroitement lié, en trois points de la chaine respiratoire, à la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate minéral. Le couplage d'une synthèse d'ATP à la respiration mitochondriale est appelé oxydation phosphorylante. Il est assuré par un système multienzymatique formé de facteurs de couplage dont certains ont déjà été isolés.

Les mitochondries sont le siège d'importants mouvements d'eau, étant aptes à se gonfler et se contracter sous l'influence de multiples facteurs, en même temps qu'elles peuvent transporter et accumuler des ions.

Toutes ces propriétés sont étroitement liées entre elles et dépendent des transporteurs et des enzymes de couplage présents dans la membrane. Or, cette dernière peut être notablement altérée pendant la cancérisation. Ainsi, ARCOS et ses collaborateurs ont-ils montré que les mitochondries perdaient la plus grande partie de leurs propriétés de gonflement pendant le temps de latence observé au cours de la cancérisation du foie induite par le 3'-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène (15). Cette rigidité des mitochondries apparaît immédiatement avant le début de la prolifération cellulaire, anarchique, caractéristique de la tumeur. Il existe une connexion entre le temps de latence et le minimum des propriétés de gonflement. Ces modifications paraissent spécifiques, puisqu'elles ne sont pas provoquées par des homologues non cancérigènes du colorant. Cette rigidité pourrait être à l'origine des déviations métaboliques spécifiques de la tumeur.

Ainsi, des variations structurales sont-elles, peut-être, étroitement associées à des variations métaboliques. On observe in situ des variations morphologiques considérables des mitochondries, mais le maximum d'information est apporté par l'étude des particules isolées. Pour cette

étude, on a recours à la centrifugation différentielle qui consiste à séparer les différents constituants de la cellule en les soumettant à des forces de gravité croissantes, après avoir obtenu la rupture de la cellule par des moyens suffisamment doux pour préserver la structure des particules.

Ici encore, le foie est un matériel de choix par suite de l'homogénéité relative de ses cellules et la facilité avec laquelle on les broie. Une technique satisfaisante de préparation des particules doit aboutir à des préparations suffisamment pures pour que les propriétés trouvées ne puissent être attribuées à des éléments contaminants. Elle doit, de plus, livrer des particules morphologiquement intactes, aux structures préservées et, enfin, les particules doivent garder leurs propriétés biochimiques spécifiques. Nous avons tout d'abord cherché une bonne technique répondant à ces exigences. Cette recherche nous a amenée à séparer la population mitochondriale en deux classes de particules différant par leur vitesse de sédimentation. Nous avons alors cherché simultanément à les purifier, et les caractériser par leurs propriétés oxydo-phosphorylantes et membranaires.

Pour comparer leurs propriétés oxydo-phosphorylantes, nous avons choisi le succinate comme substrat d'oxydation, par suite des différents avantages qu'il présente : le succinate est oxydé avec deux phosphorylations <u>couplées à la chaîne respiratoire</u>, ceci est un avantage par rapport au glutomate par exemple dont l'oxydation se fait suivant les étapes: glutamate $\longrightarrow$ α-cetoglutarate $\longrightarrow$ succinyl-coenzyme A et implique donc une phosphorylation au niveau du substrat. Enfin, le succinate est oxydé sans besoin d'activation, ce qui est un avantage par rapport au β-hydroxybutyrate, par exemple. D'autre part, le succinate est rapidement oxydé, les mesures de l'oxydation et de la phosphorylation sont ainsi plus faciles à effectuer.

Or, on a souvent remarqué que des modifications des mitochondries qui laissent intactes les oxydations phosphorylantes correspondant aux substrats du cycle de Krebs, lèsent seulement celles qui correspondent au succinate (57). Ces dernières seraient les premières altérées lorsque les mitochondries subissent des modifications in vitro ou in vivo. Enfin, la détermination des phosphorylations et des oxydations liées au succinate a été souvent utilisée pour distinguer des mitochondries de nature différente : mitochondries lourdes et légères (57), sarcosomes de coeur et mitochondries de foie(50) mitochondries provenant de cellules tumorales (58). C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'effectuer une étude systématique des oxydations liées au succinate sur les deux catégories de particules que nous avons séparées.

Pour caractériser les propriétés membranaires de ces deux populations mitochondriales, nous avons étudié leur teneur en eau et leurs réactions de gonflement. Nous avons tout d'abord déterminé leur teneur en eau. On sait, en effet, que les mitochondries sont le siège d'importants mouvements d'eau. Bornons-nous à rappeler que les mitochondries isolées présentent deux types de gonflement. Le premier, appelé "gonflement passif", correspond à leurs réactions aux changements de pression osmotique du milieu extérieur, lorsque celui-ci contient des solutés qui ne pénètrent pas dans les mitochondries. Le deuxième gonflement, dit "actif", est provoqué in vitro par de multiples substances dont certaines sont présentes dans le milieu cytoplasmique : phosphate, calcium, thyroxine (113). Cette propriété de la membrane mitochondriale peut être altérée dans de multiples conditions : elle varie avec l'âge des animaux (122), leur état de carence (104), ou à la suite d'injections d'hormones (110). Au cours de la cancérisation, on a mis en évidence une altération des propriétés

du gonflement mitochondrial, tant dans le cas du gonflement passif (28 , 92) que dans celui du gonflement actif (15, 14).

Les forces intervenant dans les variations du volume des mitochondries aboutissent toujours à un état d'équilibre caractérisé par leur teneur en eau. Ainsi, on a pu mettre en évidence, in situ, dans le foie d'un animal sain, outre des mitochondries normales, des mitochondries gonflées et celles-ci sont plus nombreuses chez des animaux malades ou carencés (104). Des mitochondries isolées par centrifugation différentielle doivent donc se présenter dans un état de gonflement significatif.

On voit ainsi l'intérêt présenté par l'étude de l'état de gonflement des mitochondries isolées par centrifugation différentielle. C'est pourquoi nous nous sommes d'abord attachée à mettre au point une méthode originale qui nous permette de déterminer cet état de gonflement et nous avons ensuite étudié cet état sur les deux classes de mitochondries que nous avons séparées.

Nous avons comparé le comportement de ces deux catégories de particules lorsqu'elles sont mises en présence de quelques promoteurs classiques de leur gonflement actif. Nous avons d'abord recherché l'influence de la thyroxine dont l'action sur les mitochondries a été très étudiée (113, 81). Le gonflement provoqué paraît être en relation avec l'état d'oxydo-réduction du NAD lié dans les mitochondries et est accompagné de modifications dans la perméabilité des particules au saccharose.

Nous avons également étudié l'influence d'un autre promoteur du gonflement : l'insuline. Il semble que l'hormone intervienne par ses groupements -S-S- qui réagissent avec les groupements -SH et S-S de la membrane mitochondriale (80). Ces deux gonflements sont inversés par l'ATP qui provoque une

extrusion active de l'eau. Cette dernière réaction est reliée aux réactions partielles des oxydations phosphorylantes (76). Nous avons également étudié cette inversion.

Nous avons, pour finir, étudié un autre type de gonflement, induit par le glutathion. Ce dernier gonflement n'est pas inversé par l'ATP, et paraît lié à l'état d'oxydo-réduction des segments de la chaîne respiratoire compris entre les cytochromes a et a_3 . On pense que le glutathion intervient in vivo dans le cycle du renouvellement mitochondrial (83). Or, au cours de notre travail, nous avons été amenée à l'hypothèse que notre fraction "lourde" était enrichie en mitochondries physiologiquement plus âgées, correspondant à une étape plus avancée de ce renouvellement obtenu sous l'influence simultanée du glutathion et des autres agents de gonflement présents dans le milieu cytoplasmique. Nous nous sommes donc intéressée à la manière dont nos deux catégories de particules subissaient ce gonflement.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I - Différentes techniques de préparation des mitochondries

1 - Première méthode de séparation des particules (Technique I)

Nous avons utilisé des rats Wistar, mâles, adultes, pesant entre 220 et 320 g. Nous avons, en effet, cherché à éviter une interférence possible de l'âge (122), ou du sexe de l'animal sur les propriétés des mitochondries. Cette deuxième question est discutée : en effet, si, d'une part, SLATER a vérifié que le sexe n'avait pas d'influence, on sait, d'autre part, que la perméabilité des mitochondries à la catalase varie avec le sexe (4). Or, cet enzyme joue un rôle important et encore mal connu dans le métabolisme de ces particules (94).

Le rapport du poids du foie au poids de l'animal est compris entre 0,035 et 0,045. Nous avons mis les rats à jeûn pendant 15 heures pour éviter l'interférence de leur stade alimentaire sur l'état des mitochondries et nous les avons tués par décapitation. Le foie a été ensuite perfusé avec du NaCl glacé isotonique à 0,9 % par le système porte, puis avec le milieu de fractionnement : saccharose 0,25 M pH 6,8 jusqu'à décoloration complète de l'organe. Nous avons ainsi assuré l'élimination des globules rouges : ceux-ci représentent en effet un facteur inconnu susceptible de fausser les résultats biochimiques. Nous avons séparé les mitochondries par centrifugation différentielle suivant la technique

de SCHNEIDER et HOGEBOOM (109). Le foie a été homogénéisé au moyen du broyeur Ultra-Turrax ; des observations ultérieures au microscope électronique nous ont montré que ce procédé de broyage permettait d'obtenir des mitochondries dont la morphologie est bien préservée. L'homogénat obtenu (au 1/10°) est soumis à une première centrifugation de 800 g pendant 10 minutes, destinée à le débarrasser des particules les plus lourdes : noyaux, cellules entières, membranes. Le liquide surnageant est ensuite soumis à une deuxième centrifugation de 9.000 g pendant 15 minutes : le culot obtenu contient les mitochondries.

Nous avons observé ces fractions au microscope à contraste de phase et avons remarqué qu'une partie importante des mitochondries avait sédimenté avec les noyaux. Nous avons donc cherché à les récupérer. C'est pourquoi nous avons remis le culot en suspension dans le saccharose 0,25 M et avons superposé cette suspension à du saccharose plus concentré (0,44 M), dans des tubes coniques ; nous l'avons centrifugé à 250 g pendant 3 minutes. Cette opération est renouvelée deux fois, les mitochondries, cette fois-ci, restent dans le surnageant.

Nous avons soumis ce surnageant à une centrifugation de 9.000 g. durant 15 minutes ; cette fois-ci, le culot nous donne les mitochondries qui avaient auparavant sédimenté avec les noyaux. Nous obtenons donc finalement deux fractions mitochondriales que nous appellerons respectivement G (fraction lourde, précipitant avec les noyaux) et M (fraction légère).

Nous avons trouvé que ces deux catégories de particules présentent des différences significatives de plusieurs propriétés : teneur en catalase, rendement des oxydations phosphorylantes, teneur en eau.

Nous discuterons dans un chapitre ultérieur de l'intérêt et de la signification de ces résultats.

2 - Mise au point d'une technique de préparation de deux populations mitochondriales distinctes (Technique II)

Nous avions donc obtenu deux fractions mitochondriales présentant entre elles des différences significatives. L'une était toutefois obtenie après une centrifugation unique, l'autre, par contre, après deux centrifugations précédées de deux mises en suspension. Or, connaissant la très grande sensibilité des mitochondries suivant les manipulations qu'elles subissent (108), nous nous sommes attachée à la recherche d'une méthode nous permettant de les séparer, tout en les soumettant à un traitement rigoureusement identique.

Pour supprimer cette différence, nous avons mis au point une méthode originale de préparation des mitochondries. Nous appellerons cette méthode Technique II.

Le foie est perfusé comme précédemment, mais le broyage est effectué dans des tubes en nitrate de cellulose contenant du saccharose 0,25 M en proportion de 2 g. de foie pour 6 ml de solution.

Le contenu de chaque tube est soumis à 3 broyages successifs de 10 secondes au broyeur Ultra-turrax ralenti de telle sorte que l'intensité est de 0,56 Amp. pour une d.d.p. de 120 volts. Ces broyages sont séparés par des temps de repos de quelques minutes et les tubes sont constamment gardés dans la glace. Nous avons ensuite repris la technique de superposition de cet homogénat, dans le saccharose 0,25 M, à du saccharose plus concentré (0,88 M), dans des tubes coniques pour une proportion de 13 ml de suspension et 4 ml de saccharose hypertonique : le diamètre du tube est égal à 2,7 cm et la distance entre le ménisque et le fond du tube : 6,8 cm.

T A B L E A U I

POURCENTAGE DES MITOCHONDRIES M et G

PAR RAPPORT AU POIDS DE FOIE UTILISE, EXPRIME EN g

Poids du rat (g)	$\frac{\text{Poids du foie}}{\text{Poids du rat (g)}}$ X 100	Poids frais du foie utilisé (g)	Poids Frais du culot (g)		$\frac{\text{Poids du culot}}{\text{Poids du foie}}$ x 100	
			M	G	M	G
254	3,1	19,2	0,97	2,26	5,1	11,7
328	3,8					
240	3,8	18,3	1,32	2,54	7,2	13,9
240	3,9					
205	4,5	17,9	1,77	3,36	9,9	18,8
195	5,0					
325	3,9	21,0	1,17	2,60	5,5	12,4
260	4,1					
345	3,6	21,3	1,49	2,79	7,0	13,0
300	3,7					

Moyenne $\pm$ E.standard : 6,9 $\pm$ 0,8 13,9 $\pm$ 1,3

Nous avons effectué une nouvelle centrifugation de 250 g. pendant 3 minutes avec le régime suivant de centrifugation : accélération, maintien à la vitesse indiquée pendant 3 minutes et arrêt automatique sans freinage. Cette opération est répétée une fois. Dans ces conditions, toutes les particules lourdes sédimentent à travers la solution de saccharose hypertonique, et les mitochondries restent dans la phase supérieure (saccharose 0,25 M). Ce "surnageant" est ensuite soumis à deux centrifugations : la première de 800 g pendant 10 minutes nous livre la fraction G, et la deuxième, de 9.000 g pendant 15 minutes, la fraction M. Ces centrifugations sont effectuées dans le rotor 296 de la centrifugeuse International (modèle PR-2). Les suspensions sont introduites dans des tubes en nitrate de cellulose de 2,5 cm de diamètre. Le volume de suspension est de 19,5 ml, la distance du ménisque au fond du tube de 4,7 cm. Le régime de centrifugation comprend:accélaration, maintien à la vitesse indiquée et arrêt automatique sans freinage.

Nous avons ensuite soumis ces deux fractions à deux mises en suspension suivies de deux centrifugations à 26.000 g pendant 20 minutes, de manière à obtenir des culots bien tassés (121). La dernière centrifugation est effectuée dans des tubes tarés au préalable, afin de pouvoir mesurer le poids frais des culots.

Dans ces conditions, nous avons obtenu dans la plupart des cas une proportion sensiblement double de mitochondries G par rapport aux mitochondries M, à partir du même homogénat initial.

Nous avons porté dans le tableau I le résultat de quelques expériences. Ces proportions ont été retrouvées dans la plupart des cas.

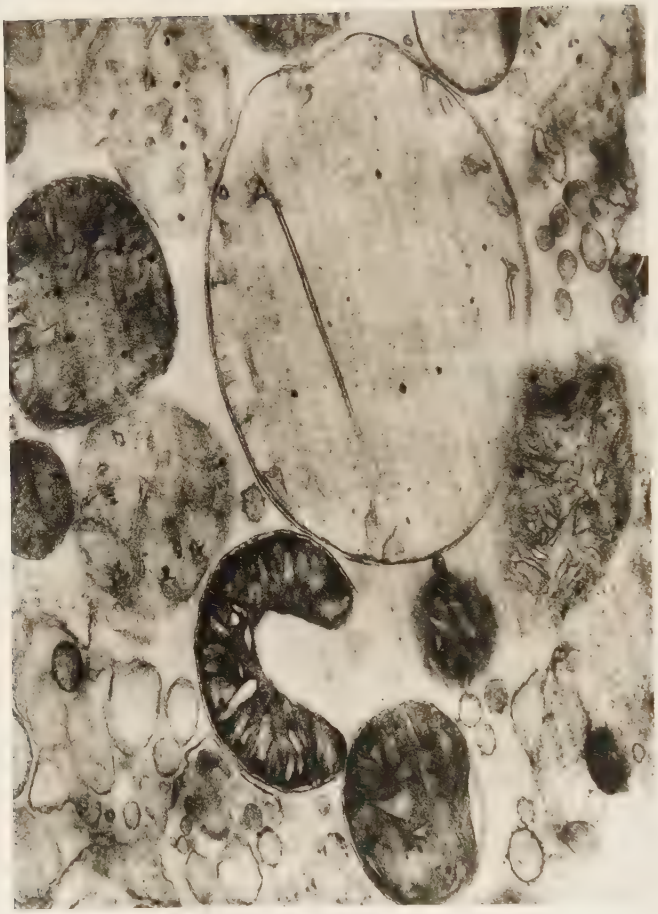


Planche Ia - Fraction G non purifiée
(Grossissement x 45.000)

Nous remarquerons que ces chiffres n'ont pas une valeur absolue : en effet, de multiples pertes se sont produites au cours des différentes étapes de la purification. Néanmoins, comme nous avons toujours travaillé dans des conditions très standardisées, il nous est permis de conclure que les mitochondries lourdes sont nettement prépondérantes dans le foie d'un rat normal, adulte.

Dans ces conditions de préparation des particules, nous avons remarqué une activité respiratoire double chez les mitochondries lourdes par rapport aux mitochondries légères. Par contre, l'aptitude aux oxydations phosphorylantes est plus élevée dans la fraction légère. Nous discuterons dans un chapitre ultérieur de la signification de ces résultats.

Nous avons eu la possibilité d'étudier nos préparations (obtenues par la deuxième méthode) au microscope électronique. Le fixateur est constitué par de l'acide osmique à 1 % dans un tampon acétate de sodium 0,028 M et véronal sodique 0,028 M pH 7,4. Les suspensions ont été mises en contact avec le fixateur pendant quelques minutes dans les proportions de 0,1 ml de suspension pour 2 ml du fixateur dans des petits tubes à centrifuger. Après une rapide centrifugation, le culot de mitochondries est laissé en contact avec le fixateur pendant une demi-heure, puis rapidement lavé dans une solution de Ringer et déshydraté par passages successifs dans de l'alcool à concentration croissante. Nous avons pris soin de ne jamais laisser les culots à sec.

Toutes les autres opérations ont été effectuées dans le laboratoire de Madame F. PREVOST (Institut de Botanique - ORSAY).

Nous montrons les microphotographies que nous avons obtenus (planche I a et b). Les clichés permettent de tirer les conclusions suivantes :

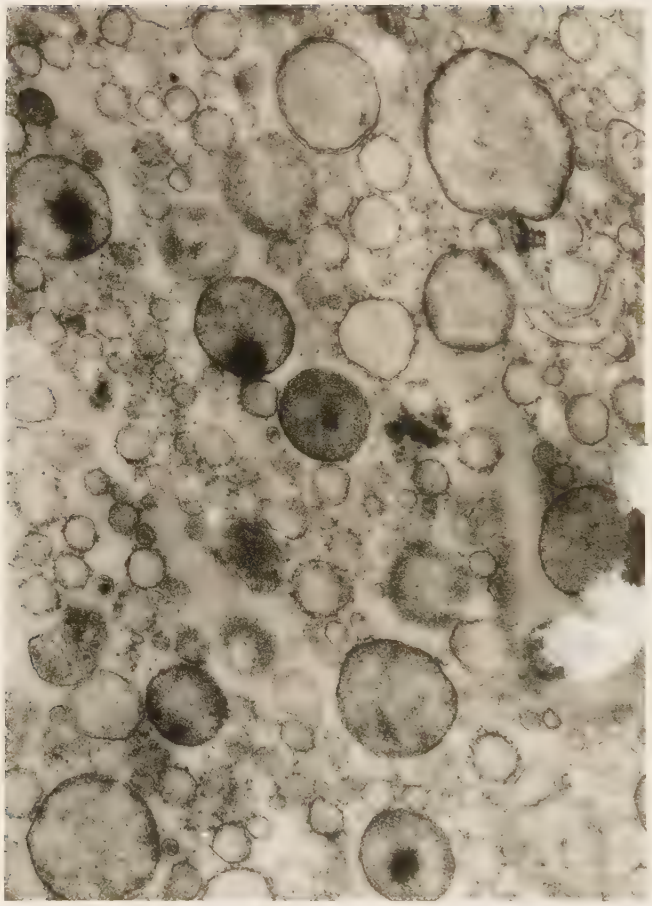


Planche Ib - Fraction M non purifiée

(Grossissement x 45.000)

Fraction G (planche I a) : Celle-ci est constituée par de belles mitochondries de forme allongée à morphologie bien préservée. Nous remarquerons la présence d'une double membrane et des "cristae" (invaginations de la membrane interne). Mais les mitochondries sont accompagnées de microsomes. Or, la présence de ces derniers est susceptible de modifier les résultats biochimiques : On sait notamment qu'ils contiennent des acides gras qui ont une action inhibitrice sur les oxydations phosphorylantes (17).

Fraction M (planche I b) : Celle-ci est constituée principalement de particules submitochondriales : certaines, munies d'une seule membrane, semblent correspondre aux lysozomes identifiés par DE DUVE (37), d'autres également munies d'une seule membrane contiennent un organite opaque aux électrons : ce sont les "microbodies" de ROUILLEER (105). De plus, nous trouvons beaucoup de microsomes. Cette fraction est donc très hétérogène. Néanmoins, elle présente un très bon pouvoir oxydophosphorylant. Or cette propriété est considérée comme spécifique des mitochondries. Signalons que les résultats d'ARCOS, relatifs aux mitochondries, sont précisément obtenus à partir de particules ayant sédimenté à des forces de gravité sensiblement proches de celles que nous employons pour séparer les particules M : 13.000 g pendant 10 minutes contre 9.000 g pendant 15 minutes dans nos expériences (15 , 46).

3 - Purification des deux populations mitochondriales (Technique III).

Nous avons cherché à obtenir des préparations plus pures et débarrassées des microsomes. La technique précédente (Technique II), légèrement modifiée, constitue la Technique III.

Nous avons séparé les deux populations mitochondriales de manière identique, mais nous les avons ensuite soumises à deux mises en suspension suivies de centrifugations aux mêmes

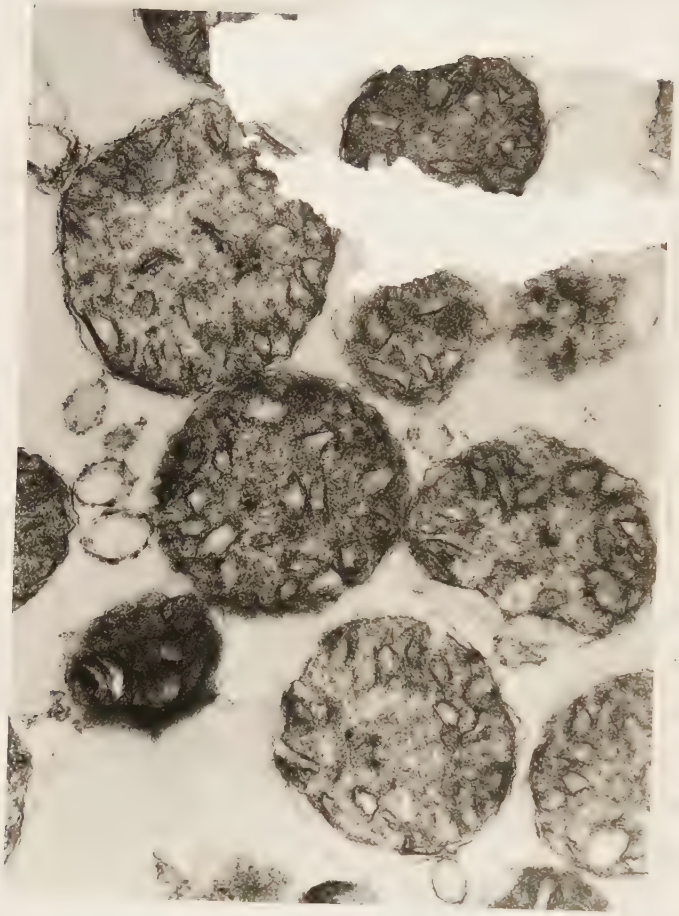


Planche II a – Fraction 6 purifiée
(Grossissement x 45.000)

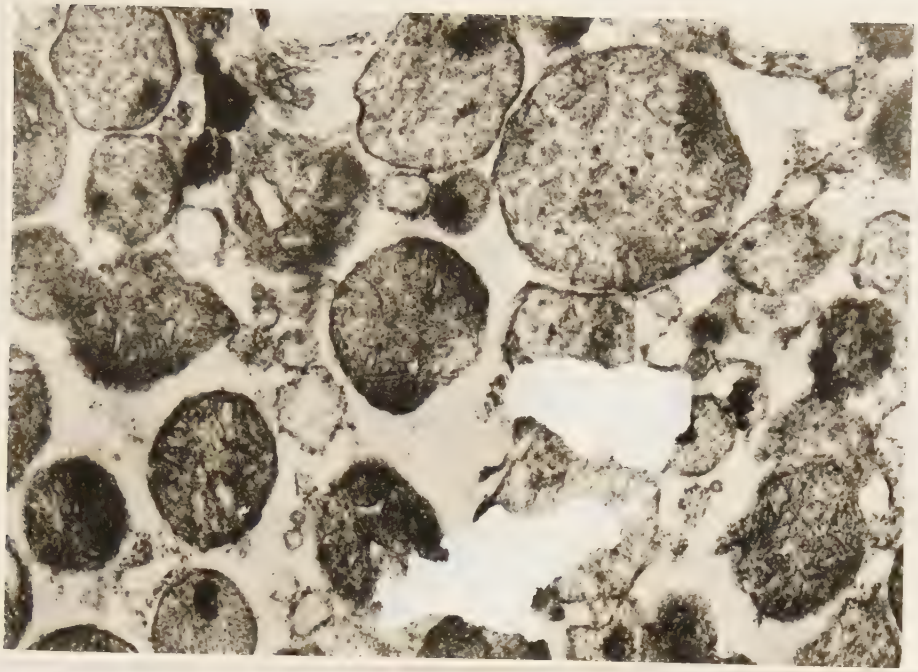


Planche IIb - Fraction M purifiée

(Grossissement x 45.000)

forces de gravité que celles nécessaires à leur séparation, c'est-à-dire 800 g pendant 10 minutes pour la fraction G et 9.000 g pendant 15 minutes pour la fraction M. Nous avons également effectué un contrôle biochimique de cette purification en dosant les protéines et les acides ribonucléiques des culots et des eaux de lavage.

On admet que le rapport ARN/protéines à une valeur de 2,84 % pour les mitochondries et 9,91 % pour les microsomes (62).

Pour les mitochondries G, non lavées, ce rapport est égal à 3,1 % et tombe à 2,2 % après le deuxième lavage. En même temps, ce rapport dans les eaux de lavage présente des valeurs de 3,7 % puis 4 %. Nous en avons déduit qu'une partie des microsomes était passée dans le surnageant.

Pour les particules M, non lavées, ce rapport était égal à 3,9 % et descendait à 1,8 % après deux lavages. En même temps, les eaux de lavage successives présentaient des valeurs de ce rapport de 4,9 % puis de 5,7 % . Nous en avons donc conclu à une purification satisfaisante des particules.

Nous avons à nouveau examiné au microscope électronique les particules ainsi préparées : Nous avons trouvé que la fraction G (planche II a) était constituée presque uniquement de mitochondries morphologiquement bien préservées. La fraction M (planche II b) présentait un aspect différent de celui des premières photographies : Elle était, cette fois-ci, constituée de mitochondries et également de particules submitochondriales : des lysosomes , mais contenait toujours une quantité notable de microsomes et ceci, en dépit du fait que cette préparation présentait une valeur satisfaisante du rapport ARN/protéines.

Dans d'autres expériences réalisées sur ces mêmes particules, la fraction M se présente à nouveau comme un mélange de particules submitochondriales et de microsomes .

Nous avons déterminé à plusieurs reprises la valeur du rapport ARN/protéines pour les particules M et G.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU II

POURCENTAGE DU RAPPORT ARN/PROTEINES POUR LES MITOCHONDRIES M ET G

M	G
5,7	2,4
5,2	2,9

Nous remarquerons que la valeur trouvée pour la fraction M est intermédiaire entre celles qui correspondent aux microsomes et celles qui correspondent aux mitochondries.

Par contre, la fraction G présente une valeur satisfaisante de ce rapport. Nous en avons conclu qu'elle était suffisamment pure alors que la fraction M est non seulement hétérogène, mais paraît subir des variations importantes d'une expérience à l'autre, et ceci, en dépit d'un procédé de préparation toujours identique. La composition de cette fraction serait donc particulièrement sensible aux variations individuelles. Pourtant, c'est sur des mitochondries sédimentées à cette vitesse qu'on a trouvé la plupart des résultats biochimiques.

Nous avons effectué quelques expériences destinées à purifier cette fraction : nous l'avons soumise à des lavages suivis de centrifugations de durée variable et nous avons déterminé la valeur du rapport ARN/protéines des particules ainsi obtenues.

TABLEAU III

VALEUR DU RAPPORT ARN/PROTEINES EXPRIME EN POURCENTAGE POUR DES TEMPS DE CENTRIFUGATION DIFFERENTS

N° d'expériences	Centrifugation de 15 minutes	Centrifugation de 10 minutes	Centrifugation de 5 minutes
1	5,1	3,2	1,8
2	4,5	3,9	1,9
3	5,7	5,6	2,2
4	3,7	2,8	2,7
5	5,4	4,7	2,3
Moyenne =	4,9	4,0	2,4

Dans une expérience (N° 4), nous avons vérifié que l'aptitude aux oxydations phosphorylantes était indépendante du taux en acides ribonucléiques des particules : c'est-à-dire la même pour les 3 fractions. Nous avons également remarqué que les propriétés de gonflement des particules n'étaient pas influencées par la diminution du rapport ARN/protéines obtenu à la suite des purifications successives.

4 - Préparation de mitochondries à partir de cellules d'ascite

Dans certains cas, enfin, nous avons préparé des mitochondries à partir de l'hépatome ascitique de ZAJDELA (126) : ces cellules correspondent à une forme très pure de tumeur hépatique transplantable et présentent un maximum de dédifférenciation. Les mitochondries des cellules d'ascite peuvent donc être considérées comme des mitochondries provenant exclusivement de cellules tumorales contrairement à celles obtenues à partir d'un hépatome solide qui est obligatoirement constitué par un mélange hétérogène de cellules normales et de cellules tumorales. La préparation des mitochondries est toutefois délicate : les cellules

ascitiques possèdent une membrane épaisse et rigide. Pour les rompre, il est nécessaire d'avoir recours à des procédés très énergiques : broyages prolongés, par exemple, qui peuvent altérer les mitochondries comme c'est le cas lorsqu'on les soumet à des oscillations soniques (58).

C'est pourquoi nous avons utilisé une autre technique qui consiste à rompre les membranes en lysant rapidement les cellules.

A) Préparation des cellules d'ascite :

Ces dernières sont obtenues après une rapide centrifugation du liquide prélevé dans la cavité péritonéale. Le culot de cellules est mis en suspension dans une solution de NaCl à 0,9 % dans des tubes coniques, et centrifugé rapidement dans la centrifugeuse Jouan. On répète cette opération jusqu'à l'élimination complète des érythrocytes qui ont sédimenté avec les cellules d'ascite : le culot final a une coloration blanche.

B) Rupture de la cellule :

Le culot de cellules est mis en suspension dans 8 à 10 volumes d'eau distillée glacée. La suspension est ensuite homogénéisée dans un broyeur de Potter pendant 3 minutes. Ensuite, on ajoute une solution hypertonique de saccharose de manière à obtenir une concentration finale en saccharose de 0,25 M. Cette suspension de particules dans le saccharose isotonique est soumise à plusieurs broyages dans le broyeur de Potter. On obtient de la sorte une suspension où les éléments figurés du cytoplasme sont bien séparés. Nous avons ensuite séparé les mitochondries comme nous l'avons indiqué (Technique I) sans chercher à récupérer les particules qui ont sédimenté avec les noyaux.

5 - Préparation de mitochondries débarrassées de leur cytochrome C endogène

Nous avons également étudié des mitochondries débarrassées de leur cytochrome C endogène en utilisant la méthode de JACOBS et SANADI (65) modifiée par MANOÏLOV (87). Cette étude a été effectuée sur les mitochondries qui constituent la fraction G . Nous avons commencé par séparer la population mitochondriale par la technique décrite (technique III). Les mitochondries ont donc été finalement sédimentées à 800 g pendant dix minutes. Ensuite, on débarrasse au maximum le culot obtenu de la solution de saccharose surnageante. On le met en suspension dans K Cl hypotonique (0,015 M) pendant dix minutes, à 0°C, dans une proportion de 20 ml de suspension pour le culot obtenu à partir de 10 g de foie frais. On centrifuge cette suspension; on remet à deux reprises le culot en suspension dans K Cl isotonique (0,15 M) et on centrifuge à 800 g pendant 10 minutes. Il a été vérifié que, dans ces conditions, 95 pour cent du cytochrome C endogène était extrait des mitochondries (65). Le culot final de mitochondries est remis en suspension dans la solution de saccharose isotonique.

II - Détermination des oxydations phosphorylantes -

Dans toute cette série d'expériences, nous avons déterminé le rapport P/O reliant le nombre d'atomes g d'oxygène absorbé au nombre de liaisons phosphate riches en énergie, formées en faisant incuber les mitochondries à 28°C, en présence du substrat (succinate), de phosphate minéral et d'un système accepteur des liaisons phosphate (glucose et hexokinase).

L'oxygène absorbé a été déterminé directement dans l'appareil de WARBURG et le phosphate estérifié, par la différence entre le phosphate présent dans le milieu au début et à la fin des incubations.

Nous avons dosé le phosphate minéral par la méthode de BRIGGS modifiée par MACHEBOEUF et DELSAL (84). Nous avons, en outre, déterminé l'activité respiratoire des mitochondries par le rapport Q_{O_2} de l'oxygène consommé par heure et par mg de protéines mitochondriales ; celles-ci ont été dosées par la méthode de LOWRY modifiée par FISZER (43).

1 - Préparation des suspensions de mitochondries

Nous avons mis nos particules en suspension dans le saccharose 0,25 M de manière à obtenir une consommation d'oxygène de l'ordre de 5 µat g pour une durée d'incubation de 20 minutes par 0,3 ml de la suspension. On a souvent évalué cette "dilution" par rapport au poids frais du foie utilisé au départ pour préparer les mitochondries (63). Quant à nous, nous avons toujours effectué la dernière centrifugation dans des tubes préalablement tarés qui nous servent à déterminer le poids frais des culots. Ceux-ci étaient ensuite additionnés d'un volume de solution de saccharose 0,25 M égal à 3 fois le poids frais pour les mitochondries M et à 10 fois pour les mitochondries G. Ces suspensions ont ensuite été diluées 20 fois, et nous en avons mesuré la densité optique au colorimètre JOUAN à 700 mµ . Si cela s'avérait nécessaire, nous avons réajusté les dilutions pour avoir une D.O. de l'ordre de 0,600 pour les particules M, et 0,450 pour les particules G. Dans ces conditions, nous avions 2,7 à 5 mg de protéines mitochondriales M, et 1,4 à 4,9 mg de protéines mitochondriales G dans un volume total de 2,2 ml du milieu réactionnel. HUNTER signale que ces conditions sont satisfaisantes (63).

2 - Milieu réactionnel

Nous avons utilisé le milieu réactionnel de KHOUVINE (125). Dans le tableau IV, nous le comparons aux milieux de HUNTER (63) et de COPENHAVER et LARDY (31). Cette comparaison

T A B L E A U IV

MILIEU D'INCUBATION
POUR LA DETERMINATION
DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES DES MITOCHONDRIES

KHOUVINE				Copenhaver et Lardy (m M)	HUNTER (mM)
R é a c t i f s	Volume (ml)	Molarité	mM dans la fiole		
Tampon phosphate	0,3	0,1	13,6	40	10 à 13
A T P	0,3	0,025	3,4	6,5	1 à 2
TRIS	0,3	0,1	13,6		
N a F	0,2	0,25	22,7		10 à 20
Saccharose (ou KCl)	0,2	0,25	22,7	complété au volume voulu	complété au volume voulu
Succinate de Na	0,2	0,5	45,4	20	
Hexokinase	0,2	3 mg/ml		50	en excès
Glucose	0,1	0,5	22,7	50	20
Mg Cl_2	0,1	0,25	11,3	22,5(Mg SO_4)	5 à 7
Mitochondries	0,3				
TOTAL	2,2				

nous conduit aux remarques suivantes : (Tableau IV)

1) Nous avons utilisé le phosphate à une concentration finale de 14 mM, jugée suffisante par certains auteurs pour une absorption de 50 mm^3 d'O_2 en 20 minutes (63). Néanmoins, d'autres estiment qu'il est préférable d'utiliser le phosphate en plus grand excès : on sait que le phosphate est un facteur limitant de la respiration (73). Ainsi nous avons remarqué dans quelques expériences, qu'il y avait successivement deux vitesses de respiration, la deuxième étant plus lente : en effet, lorsqu'on représente la variation de l'absorption d'oxygène en fonction du temps, on obtient deux droites de pentes différentes. De plus, nous avons remarqué (Technique III) que plus les mitochondries étaient purifiées, plus ce phénomène était fréquent.

2) Nous avons utilisé le fluorure de sodium à une concentration de 22 mM, identique à celle indiquée par HUNTER (63) pour inhiber les activités phosphatasique et ATPasique du milieu, principalement pour éviter l'hydrolyse du glucose-6-phosphate par les phosphatases présentes dans les lysozomes et les microsomes et qui est susceptible de fausser le dosage du phosphate minéral.

3) Nous avons pris soin d'introduire dans le milieu réactionnel (tubulure latérale de la fiole de WARBURG) le système accepteur des liaisons phosphates riches en énergie de l'ATP à une concentration suffisante pour transférer le double du phosphate minéral présent dans le milieu. Nous avons cherché à obtenir un système accepteur de phosphate très actif : glucose + hexokinase à 3 mg/ml. Ce système est, en effet, indispensable pour obtenir une respiration maximale (73). De plus, il est nécessaire de soustraire immédiatement l'ATP formé dans la mitochondrie pour maintenir très basse la valeur du rapport $(ATP)/(ADP).(P_i)$ (potentiel phosphate) ; on sait en effet que l'ATP mitochondrial inhibe la respiration des mitochondries bien couplées ; c'est d'ailleurs, avec le contrôle respiratoire

(index de CHANCE (27)) le meilleur critère actuel de l'intégrité des particules. De plus l'ATP mitochondrial peut entraîner la formation du syccinyl-CoA par l'un des mécanismes de régulation intramitochondriale qui soustraient les intermédiaires du cycle de KREBS (formation de l'acide d-aminolévulinique et des porphyrines). Nous avons aussi renforcé la concentration de l'hexokinase parce qu'elle inhibe l'ATPase (99).

4) Nous avons utilisé le succinate comme substrat d'oxydation à une concentration suffisante : 45 mM pour limiter l'oxydation à l'étape succinate-fumarate (50).

5) Mg Cl_2 est introduit en dernier lieu pour éviter la précipitation de $Mg_3 (PO_4)_2$. L'ion Mg^{++} est en effet indispensable pour l'incorporation du P minéral dans l'ATP (106) ; de plus, il a été longtemps admis que Mg^{++} assurerait avec l'ARN une liaison entre le facteur particulaire et le facteur soluble pour la reconstitution des oxydations phosphorylantes(99).

6) On ajoute les mitochondries immédiatement avant le début de l'incubation pour éviter leur mise en contact avec le substrat susceptible de les modifier. *

3 - Mode opératoire

Nous avons successivement utilisé deux techniques différentes : la première, usuelle au laboratoire, la deuxième, mise au point par nous-mêmes.

Ière technique : Nous la décrirons brièvement : on fixe les fioles, maintenues jusque-là dans la glace, aux manomètres et on les transfère immédiatement dans le bain (28°C). Après une équilibration thermique rapide (5 minutes); on ferme les robinets des manomètres, on mélange le contenu de l'ampoule latérale (glucose + hexokinase) avec celui du compartiment central et on effectue les lectures manométriques. Suivant l'intensité des échanges, celles-ci durent 15 ou 20 minutes.

* en ajoutant, dans une expérience, les mitochondries une heure avant l'incubation, nous avons en effet remarqué que la respiration était normale ; par contre, la phosphorylation ne débutait qu'après les 15 premières minutes d'incubation.

Ensuite, les fioles sont rapidement mises dans la glace et on précipite les protéines mitochondriales avec l'acide trichloracétique à 20% . Au bout de 5 minutes de contact, on centrifuge rapidement et on prélève le liquide surnageant : on introduit 1 ml du surnageant dans 4 ml d'acétate de sodium 0,1 M. On dose le phosphate minéral de cette solution (stabilisé à pH 4,5) par la méthode de BRIGGS, modifiée par DELSAL et MACHEBOEUF (84).

On récupère les protéines mitochondriales, on les déshydrate et on les délipide à l'alcool et à l'éther. On les dissout dans la soude 0,6 N et on dose les protéines par la méthode de LOWRY modifiée par FISZER (43).

Cette technique présente l'inconvénient de ne pas vérifier la proportionnalité entre l'absorption de l'oxygène et la disparition du phosphate minéral. Pour tenir compte de ce facteur, nous avons mis au point une technique légèrement différente :

2ème technique : Nous avons procédé comme précédemment, mais dans chaque expérience, nous avons vérifié la proportionnalité entre l'absorption de l'oxygène et la disparition du phosphate minéral et nous avons toujours tenu compte de cette proportionnalité. Chaque détermination résulte alors de 7 mesures indépendantes. Tout de suite après l'équilibration thermique et le mélange, nous avons ajouté le TCA pour obtenir le phosphate minéral au temps zéro. Tout en effectuant les mesures manométriques, nous avons ajouté le TCA toutes les 5 minutes dans une fiole et dosé le phosphate minéral présent dans le milieu réactionnel. Nous avons ainsi obtenu la valeur du phosphate minéral à des intervalles de temps déterminés. Nous avons porté sur un graphique les valeurs obtenues en fonction du temps. Nous avons également porté sur un graphique l'absorption de l'oxygène en fonction du temps ; nous avons obtenu finalement plusieurs droites représentant l'absorption de l'oxygène et une seule droite pour les différentes valeurs du phosphate minéral présent

après 0,5 , 10 , 15 , 20 , 25 et 30 minutes d'incubation.

Sur dix expériences, nous avons observé 7 fois des variations linéaires de l'absorption d'oxygène et de la disparition du phosphate minéral en fonction du temps. Nous avons provisoirement éliminé de nos résultats les expériences qui ne donnaient pas cette variation linéaire, leur interprétation étant plus difficile.

Dans tous les cas de variations linéaires, nous avons calculé la pente des droites par la méthode des moindres carrés.

III - Détermination de la teneur en eau

On détermine souvent la teneur en eau des particules d' un culot par la méthode de dessication qui consiste à évaluer, d'une part le poids frais d'un échantillon donné, d'autre part son poids sec après un passage à l'étuve à 108° C pendant 48 heures. Le poids de l'eau est alors obtenu par la différence entre ces deux grandeurs. Mais tout culot de particules obtenu par centrifugation renferme une certaine quantité du liquide surnageant entraîné avec les particules, et nous verrons que cette quantité d'eau interparticulaire peut représenter 20 à 60 pour cent de l'eau totale contenue dans le culot. Nous avons donc cherché une technique originale pour déterminer ce volume (converti en mg en tenant compte de la densité de l'eau) du liquide interparticulaire en combinant les méthodes de dilution isotopique et de dessication.

Description de la méthode

a) Définition de la teneur en eau :

Nous avons défini la teneur en eau des particules par le rapport entre le poids de l'eau intramitochondriale et le poids frais des mitochondries. Les poids frais des mitochondries est calculé en retranchant du poids frais total du culot le poids

de l'eau intermitochondriale plus celui des sels dissous dans cette dernière (solution de RINGER de composition connue).

b) Détermination de l'eau intermitochondriale

Nous avons déterminé la fraction liquide interparticulaire par la technique de dilution isotopique : si l'on ajoute à un culot de mitochondries un volume connu d'une solution de substance radioactive non pénétrante, la dilution de la radioactivité mesurée sera fonction du volume du liquide interparticulaire. Nous avons choisi l'ADP-^{14}C , parce que l'on pensait que ce nucléotide ne pénétrait pas dans les mitochondries (121) et parce qu'il a une action stabilisatrice sur la structure des particules (32).

Dans une première série d'expériences, nous avons remarqué qu'une quantité notable d'ADP était soustraite du milieu par adsorption ou pénétration véritable dans les particules. Nous avons donc apporté quelques modifications à notre première technique, pour déterminer cette quantité d'ADP radioactif fixé par les mitochondries.

Ière technique : Nous avons utilisé l'ADP-8-^{14}C (SCHWARZ BIO-RESEARCH Inc. U.S.A.) de radioactivité spécifique 1,45 µC/mg. Nous en avons préparé des solutions correspondant à une radioactivité mesurée de 1.000 coups par minute par 100 µl de solution. La solution d' ADP marqué avait donc une concentration de 0,03 mg/ml dans une solution de KREBS-RINGER.

Mode opératoire : On prélève un échantillon de mitochondries à l'aide d'une spatule et on l'introduit dans un petit tube de centrifugeuse Spinco préalablement taré et pesé. On ajoute un volume donné de la solution radioactive (100 à 400 µl suivant les cas), on agite très soigneusement avec un petit agitateur de verre à bout effilé et on centrifuge tout de suite à 26.000 g pendant 20 minutes . On prélève le surnageant avec une micropipette. Toutes ces opérations sont effectuées à 0° C. Parallèlement, sur un autre échantillon également

pesé, on détermine le poids de l'eau totale du culot par la méthode de dessication.

Ensuite, on détermine la radioactivité du surnageant, qui correspond à celle de la solution initiale, diluée par l'eau interparticulaire du culot de mitochondries.

Dans ce but, on prélève 100 µl de chaque solution, on l'étale sur des plaques métalliques de manière à recouvrir très régulièrement un cercle de 2,4 cm de diamètre (il est important que la surface recouverte ait une épaisseur uniforme). On sèche les plaques en les exposant au rayonnement d'une lampe infra-rouge et on mesure la radioactivité de chaque plaque.

Soient : A la radioactivité de la solution initiale par unité de volume, V le volume liquide ajouté, X le volume interparticulaire à déterminer et B la radioactivité du surnageant par unité de volume, on arrive à l'équation :

$$A \times V = B\ (V + X) \qquad (1)$$

on en déduit le volume liquide intermitochondrial X.

c) Détermination de l'eau intramitochondriale :

L'eau intramitochondriale est ensuite calculée par la différence entre la valeur de l'eau totale du culot, obtenue par dessication, et celle de l'eau intermitochondriale évaluées en grammes.

2ème technique : Détermination de la radioactivité fixée par les mitochondries

On utilise le procédé indiqué plus haut mais on le complète de la façon suivante : les particules une fois séparées de la solution radioactive sont lavées à deux reprises avec la solution de Ringer contenant de la polyvinylpyrrolidone à 10 % pour éviter la diffusion de l'ADP hors des particules (49). On élimine ainsi la radioactivité contenue dans la fraction liquide interparticulaire. Ensuite on les lyse avec

de l'eau distillée et on amène la suspension obtenue à un volume défini . On dose la radioactivité de cette suspension de particules lysées, en effectuant une correction pour l'auto-absorption (111).

Pour C = radioactivité par unité de volume de cette suspension, et V' son volume total. L'équation précédente devient :

$$A \times V = B \times (V + x) + (C \times V')$$

on en déduit le volume liquide interparticulaire : x
L'eau intramitochondriale est calculée comme précédemment par la différence entre le poids de l'eau totale et celui de l'eau intermitochondriale (x).

IV - Etude du gonflement des particules

La variation du volume des particules en suspension est liée à la variation de la densité optique de cette dernière à 520 mμ (98). On constate que la densité optique est alors inversement proportionnelle au volume des particules. Néanmoins, la densité optique dépend également d'autres paramètres tels que : différence d'indice de réfraction entre le milieu de dispersion et les particules, arrangement structural des éléments réfractants et concentration de la suspension en particules (78). C'est pourquoi la détermination de la densité optique donne le sens de la variation plus qu'une appréciation quantitative. Toutefois lorsque la courbe représentative de la variation de la densité optique de la suspension en fonction du temps accuse un palier, les particules ont atteint un état d'équilibre. A ce moment, les mesures gravimétriques, quantitatives et précises, que nous avons décrites dans le paragraphe précédent, deviennent réalisables.

Nous avons suivi le gonflement des particules dans différents milieux à l'aide du spectrophotomètre d'EPPENDORF

à enregistrement automatique, en raison des différents avantages qu'il présente : d'une part, l'enregistrement automatique avec un réglage facultatif du cylindre enregistreur donne la possibilité de suivre des variations instantanées ; d'autre part, il est muni d'un dispositif de thermostatisation assurant une température constante dans les cuves. Nous avons pu, de ce fait, effectuer nos déterminations directement dans les cuves.

Nous avons choisi le filtre donnant une longueur d'onde voisine de 520 mμ : Hg 546 mμ . Dans un essai préliminaire, nous avons comparé les variations de la densité optique de suspensions, d'une part à 520 mμ , de l'autre à 545 mμ . Nous avons trouvé une absorption légèrement plus élevée à 520 mμ et cet écart s'accentue aux faibles densités optiques.

Mode opératoire : Dans des cuves de 1 cm d'épaisseur, on introduit 1,9 ml du milieu réactionnel contenant le promoteur de gonflement choisi. On attend trois minutes la stabilisation thermique. Ensuite, on introduit rapidement 0,1 ml de la suspension de mitochondries. Celles-ci ont été au préalable "diluées" de manière à présenter, dans les conditions indiquées, une absorption initiale de 0,500 . On agite rapidement avec une spatule de verre et on suit la variation de la densité optique jusqu'à obtention d'un nouvel équilibre qui se traduit par un palier de la courbe représentant les variations de la densité optique en fonction du temps.

A ce moment, on introduit rapidement, à la micropipette, ou directement sur la spatule, 0,020 ml de la solution d'ATP ; on agite et on suit à nouveau la variation de densité optique ainsi provoquée.

Nous avons vérifié au préalable, en introduisant dans la cuve des volumes croissants de suspension, que la densité optique initiale était proportionnelle à la quantité de particules introduites. Nous avons donc utilisé cette densité optique initiale comme mesure de la quantité de particules présentes dans le milieu réactionnel.

Préparation des agents de gonflement

Nous avons utilisé la Thyroxine T_4 (Tétraïodotyronine) synthétique qui est le dérivé le plus actif de cette hormone. Nous en avons préparé des solutions à la concentration de $1 \times 10^{-3}M$ dans de l'eau alcalinisée à pH 8, à 37°C, juste avant de les employer. Ensuite la solution était diluée 100 fois dans le milieu expérimental.

Nous avons utilisé l'insuline "NOVA" en solution aqueuse à la concentration finale de $0,3 \times 10^{-6}M$ et l'ATP neutralisé en solution aqueuse, à la concentration finale de $3 \times 10^{-3}M$.

Nous avons préparé une solution de glutathion HOFFMANN-LAROCHE à la concentration finale de 0,01 M (concentration physiologique de ce corps dans le milieu cytoplasmique où baignent les mitochondries).

Toutes ces réactions ont été étudiées à pH 7,4 et 23°C. Nous n'avons pas changé le pH pour étudier le gonflement induit par le glutathion, ce gonflement étant maximum au pH 6,5 (83).

Nous avons suivi le gonflement des particules tantôt dans le saccharose 0,25 M , tantôt dans le KCl à 1,15 % et ces deux solutions étaient amenées au pH indiqué avec le tampon(TRIS. 0,2 M - HCl).

TABLEAU V

VALEUR DU RAPPORT P/O DES MITOCHONDRIES M ET G PREPAREES ET EXPERIMENTEES DANS LA SOLUTION DE RINGER

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	2,30	
2	2,04	
3	1,82	1,40
4	1,68 1,64	1,22 1,18
5	1,40 1,60	0,83 0,93
6	1,53 1,53	1,08 1,23
7		1,12 1,20
8	1,84 1,62	1,63 1,48
9		0,84
Moyenne ± E. Standard	1,70 ± 0,05	1,10 ± 0,07

Le milieu d'incubation est donné dans le Tableau IV, mais la solution de saccharose 0,25 M est remplacée par la solution de RINGER dont la composition est donnée dans le Tableau VI. Les oxydations phosphorylantes sont déterminées par la Ière Technique (voir le texte).

CHAPITRE II

OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES ET PROPRIETES MEMBRANAIRES

I - OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES

Nous avons étudié les oxydations phosphorylantes des deux classes de particules que nous avons séparées suivant les différentes techniques décrites.

Nous avons, en plus, recherché l'influence de quelques modifications apportées soit à ces techniques, soit au milieu de préparation des particules.

1 - Oxydations phosphorylantes des mitochondries M & G dans une solution de KREBS-RINGER

Nous avons effectué ces déterminations parallèlement à celles de la teneur en eau (en présence d'ADP) des mitochondries M et G suivant l'idée traditionnelle qui veut que l'intégrité des particules soit vérifiée par le rendement des oxydations phosphorylantes. C'est pourquoi nous avons d'abord lavé les particules à deux reprises dans la solution de KREBS-RINGER pour les débarrasser totalement du saccharose et, en outre,nous avons introduit la solution de KREBS-RINGER à la place de la solution de saccharose dans les fioles de WARBURG. Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats consignés dans le Tableau V.

Les résultats consignés sur ce tableau nous montrent que les mitochondries lourdes (G) présentent une valeur moyenne de P/O égale à 1,10 , et les mitochondries légères (M) une valeur égale à 1,70.

T A B L E A U VI

COMPOSITION DE LA SOLUTION DE RINGER

Solutions constituantes	Concentrations des solutions constituantes 10^{-3} M	Volume des solutions constituantes ml	Concentration des constituants dans la solution de Ringer 10^{-3} M	Concentration des constituants dans le milieu d'incubation 10^{-3} M
Na Cl	154	100	141	38
K Cl	154	4	5,65	1,5
$Ca\ Cl_2$	110	3	2,9	0,78
$KH_2\ PO_4$	154	1	1,41	0,38
$Mg\ SO_4$	154	1	1,41	0,38

T A B L E A U VII

MILIEUX REACTIONNELS UTILISES POUR LA DETERMINATION DU RAPPORT P:O ACCUMULATION

	Milieu de Lehninger et Rossi	Milieu de Vasington et Murphy	Notre milieu
Mitochondries	3 mg	2 à 4 mg	2 à 5 mg
Succinate	10 mM	6,7 mM	45 mM
$Mg\ Cl_2$	10 mM	10 mM	11,3 mM
Na Cl	80 mM	38 mM	(38)
$Ca\ Cl_2$	4 mM	2,5 mM	0,78 mM
A T P	3,0 mM	3 mM	3,4 mM
P minéral	4 mM	4 mM	13,6 mM
TRIS		5 mM	13,6 mM

Pourtant le milieu d'incubation contient entre autres ions Ca^{++} à une concentration finale de 0,78 mM. De plus, les mitochondries ont été lavées à deux reprises dans la solution de KREBS-RINGER où l'ion Ca^{++} était à la concentration de 2,9 mM , comme on le voit sur le Tableau VI. Or, il est notoire que l'ion Ca^{++} inhibe totalement la phosphorylation de l'ADP (75)

Intriguée par ces résultats contradictoires, nous avons cherché quel autre mécanisme expliquerait la disparition du phosphate minéral du milieu en présence de mitochondries respirantes.

Nous remarquerons à ce sujet que les mitochondries en présence du phosphate contenu dans la solution de RINGER ont gonflé et ont perdu le NAD intramitochondrial (64). Toutefois, la respiration avec le succinate comme substrat reste toujours possible, puisque celle-ci a lieu sans le NAD.

Or, récemment, LEHNINGER et ROSSI ont mis en évidence une nouvelle propriété des mitochondries du foie de rat : leur aptitude à accumuler le phosphate minéral ; cette accumulation nécessitant, soit la respiration, soit un apport direct de l'énergie sous forme d'ATP dans le milieu : cette accumulation active est inhibée par les découplants et aussi par certains inhibiteurs du transport des électrons (82).

Nous avons donc comparé dans le Tableau VII la composition du milieu réactionnel utilisé par ces auteurs à celle de notre propre milieu réactionnel et aussi à celle d'un milieu décrit par VASINGTON et MURPHY (115) pour l'étude de l'accumulation du calcium par les mitochondries de rein.

Le Tableau VII montre que les milieux réactionnels de LEHINGER et ROSSI, d'une part, de VASINGTON et MURPHY de l'autre, et les nôtres sont très semblables. De plus, la durée d'incubation est la même : 20 minutes.

Toutefois, notre milieu est moins concentré en calcium et plus concentré en phosphate. Mais tous les ions et substrats nécessaires à cette accumulation active du phosphate sont présents : phosphate, calcium, magnésium, et succinate. De plus, pour des concentrations élevées en phosphate minéral, LEHNINGER et ROSSI ont vérifié que le phosphate minéral exogène était le précurseur à 90 % du phosphate minéral fixé par les particules. Ceci est précisément le cas pour notre milieu réactionnel, où le phosphate minéral est à une concentration de 13 mM , concentration dont l'effet a été étudié par ces auteurs. Il est donc tentant de penser que nous avons ainsi déterminé le phosphate minéral accumulé dans les mitochondries. Dans ces conditions, les rapports P/O que nous avons déterminés seraient les rapports P : O accumulation tels que les ont définis LEHNINGER et ROSSI : le rapport moléculaire entre les quantités d'oxygène absorbé et de phosphate accumulé par les mitochondries au moyen de l'énergie d'oxydo-réduction fournie par l'oxydation du succinate. Et, de plus, ces auteurs ont montré que l'introduction dans le milieu du mélange glucose + hexokinase n'était pas suivie d'une phosphorylation de l'ADP.

On peut objecter à cette hypothèse que l'hydroxyapatite, qui est sans doute le composé fixé dans les granules opaques au microscope électronique, est soluble dans l'acide trichloracétique qui a servi à dénaturer les protéines mitochondriales. Toutefois, la rapidité de la précipitation a peut-être assuré une coprécipitation de ce sel avec les protéines. Nous remarquerons que les mitochondries légères présentent un P : O accumulation nettement plus élevé que les mitochondries lourdes. Cependant, par des observations ultérieures au microscope électronique, nous avons vu que ces mitochondries légères sont très contaminées par les microsomes. Mais LEHNINGER et ROSSI ont aussi vérifié que les microsomes n'absorbent ni le calcium ni le phosphate dans les conditions indiquées. En outre, l'absorption

du phosphate par les noyaux est aussi négligeable par rapport à la quantité massive de phosphate et de calcium accumulés dans les mitochondries.

Il est intéressant de constater que des mitochondries préparées de la même manière (Technique II), mais incubées dans le saccharose et en absence de la solution de KREBS-RINGER, donnent la même valeur du rapport P/O des oxydations phosphorylantes. Enfin, des observations de LEHNINGER au microscope électronique de ces mitochondries,ainsi chargées en phosphate et en calcium, ont mis en évidence deux types de mitochondries. L'un correspond à des mitochondries gonflées mais d'aspect normal (ce serait notre type G), l'autre à des mitochondries "aberrantes" avec une matrice contractée et des membranes séparées, riches en granules opaques aux électrons : celles-ci seraient les "granules denses" aptes à fixer les ions divalents. Nous n'avons pas eu la possibilité de contrôler nos propres préparations au microscope électronique, mais il est permis de penser que la fraction "M" est enrichie en mitochondries aptes à accumuler l'hydroxyapatite comme sel stable et insoluble au pH du milieu intramitochondrial.

2 - Oxydations phosphorylantes des mitochondries M et G préparées dans le saccharose et centrifugées à 26.000 g pendant 20 min. (Technique II)

Dans ces expériences, nous avons éliminé deux résultats où les oxydations phosphorylantes des mitochondries G présentaient une valeur supérieure à la valeur théorique, sans doute par suite de l'intervention de l'étape oxydative ultérieure : oxydation du malate en oxaloacétate. Pourtant, dans ces deux cas, les variations de l'absorption d'oxygène et de la disparition du phosphate minéral en fonction du temps ont été linéaires. Nous avons également éliminé de nos résultats une expérience où ces variations présentaient deux vitesses successives (expérience n° 4).

T A B L E A U VIII

VALEUR DU P/O DES MITOCHONDRIES M ET G
PREPAREES DANS LE SACCHAROSE 0,25 M ET
CENTRIFUGEES A 26.000 g PENDANT 20 MINUTES

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	1,76	1,28
2	1,56	1,46
3	1,91	1,64
7	1,62	1,32
9	1,68	1,25
moyenne ± E. standard	1,71 ± 0,06	1,39 ± 0,07

Les mitochondries sont préparées suivant la Technique II.

Les oxydations phosphorylantes sont déterminées par la deuxième technique (voir le Texte)

Le milieu d'incubation est donné dans le Tableau IV.

T A B L E A U IX

ACTIVITE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES M ET G
PREPAREES DANS LE SACCHAROSE 0,25 M ET
CENTRIFUGEES A 26.000 g PENDANT 20 MINUTES

Valeur du rapport Q_{O_2}
(m^3 O_2/heure/mg protéines mitochondriales)

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	24,4	56,4
	24,2	
7	28,2	57,6
	28,2	60,0
9	19,8	49,2
	19,8	39,0
Moyenne ± E. standard	24,1 ± 2,3	53,9 ± 2,8

Le milieu d'incubation est donné dans le Tableau IV.
L'absorption d'oxygène est mesurée dans l'appareil de WARBURG. Les protéines mitochondriales sont dosées par la méthode de LOWRY. Chaque détermination est effectuée sur deux fioles indépendantes.

En calculant la moyenne des cinq autres résultats, nous obtenons une valeur moyenne de P/O analogue à celle observée dans les expériences effectuées dans le milieu de RINGER. Or, dans ces deux cas, aussi, ces fractions avaient été centrifugées à 26.000 g. (Voir Tableau VIII).

Cette fois-ci, nous avons eu la possibilité de contrôler nos préparations au microscope électronique :

. la fraction G est constituée par de belles mitochondries de forme allongée tout à fait analogues à celles que l'on trouve in situ, mais elle est fortement contaminée par les microsomes. Donc le dosage du phosphate minéral donne des résultats qui peuvent être attribués à une résultante de multiples facteurs, comme cela a été trouvé sur des homogénats entiers (96). En particulier, les microsomes contiennent des acides gras à action découplante bien connue (17). Il serait donc intéressant de déterminer les P/O de cette fraction hétérogène en présence de sérumalbumine, afin de vérifier si les P/O observés seraient alors améliorés.

. la fraction M est encore plus hétérogène. Elle est, en particulier, constituée de lysosomes riches en phosphatases (37) et de "microbodies" dont la participation aux oxydations phosphorylantes n'est pas encore connue. Si, toutefois, le fluorure inhibe l'activité des phosphatases, le P/O ainsi déterminé reste tout de même valable.

Nous ne nous expliquons pas cette valeur élevée du P/O trouvée sur une fraction très hétérogène, mais nous pensons que les "microbodies" en sont peut-être responsables, car ils sont riches en catalase, et celle-ci participe aux oxydations phosphorylantes avec un donneur d'électrons encore inconnu (27). D'autre part, le granule dense aux électrons pourrait aussi être un site de précipitation de l'hydroxyapatite et ainsi participer à l'accumulation du phosphate minéral.

T A B L E A U X

VALEUR DU RAPPORT P/O DES MITOCHONDRIES PURIFIEES

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	1,06	2,03
5	1,10	2,08
Moyenne	1,05 ± 0,05	2,05 ± 0,03

Les mitochondries sont préparées suivant la Tecnhique III.
Les conditions expérimentales sont indiquées dans le Tableau VIII

T A B L E A U XI

CONTROLE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES M et G PURIFIEES

N° exp.		Respiration en présence de l'accepteur des liaisons phosphate mm^3 O_2/minute (1)	Respiration en absence do l'accepteur des liaisons phosphate mm^3 O_2/minute (2)	Contrôle respiratoire (1 : 2)
1	M	4,1	4,1	1
	G	1,6	1,8	0,9
2	M	4,2	3,8	1,10
	G	3,0	1,9	1,6
3	M	3,9	2,8	1,4
	G	3,3	1,4	2,3

Moyenne ± E.standard M = 1,17 ± 0,12 G = 1,60 ± 0,20

Le milieu réactionnel est donné dans le Tableau IV. La respiration en absence du système accepteur des liaisons phosphate est mesurée en remplaçant dans l'ampoule latérale d'une cellule de WARBURG le mélange glucose + hexokinase par un même volume de saccharose 0,25 M.

T A B L E A U XII

ACTIVITE RESPIRATOIRE DES MITOCHONDRIES M ET G PURIFIEES

Valeur de Q_{O_2}

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	45,0 41,4	64,8 75,0
2	54,6	84,6
3	61,2	103,2
5	21,0	46,2
Moyenne ± E. Stand.	44,6 ± 6,8	77,8 ± 9,5

Les conditions expérimentales sont décrites dans le Tableau IX

3 - Oxydations phosphorylantes des mitochondries purifiées (Technique III)

De cinq expériences, nous ne retiendrons que deux d'entre elles : en effet, dans les trois autres cas, les droites figuratives de l'absorption d'oxygène et de la disparition du phosphate minéral en fonction du temps avaient ces deux pentes différentes dont nous avons parlé plus haut. L'une des droites, en plus, a une allure hyperbolique. Nous donnons les résultats obtenus sur le Tableau X.

La valeur du P/O,obtenue pour les mitochondries G, correspond bien, cette fois-ci, à la valeur théorique, c'est-à-dire $\frac{2}{}$.

Nous avons également déterminé la respiration des mitochondries en absence du système accepteur des liaisons phosphate (73) et, dans ce cas, l'ampoule latérale de la cellule de Warburg contenait 0,2 ml de la solution de saccharose 0,25 M et non le mélange glucose + hexokinase. Nous présentons les résultats obtenus sur le Tableau XI.

Nous avons remarqué que les phosphorylations sont découplées puisque l'index du contrôle respiratoire est de l'ordre de 1,2 pour les particules M et 1,6 pour les particules G alors que cette valeur devrait être comprise entre 3 et 5 pour des mitochondries en bon état (73). Or, on sait actuellement que le rapport P/O n'est pas le meilleur critère de l'intégrité des particules, mais que l'inhibition de la respiration par l'ATP (68), et le contrôle respiratoire (index de CHANCE) (27) sont les moyens les plus sûrs de vérifier cette intégrité.

Nous remarquons que, cette fois-ci, le P/O des mitochondries M est faible et voisin de l'unité. Nous nous sommes demandé donc quel pouvait être le facteur actif qui, dans le premier cas (présence simultanée de microsomes, de lysosomes et de microbodies), produisait cette valeur du rapport P/O qui paraît

satisfaisante. Or, dans cette fraction à P/O faible, les lysosomes et les microsomes sont toujours présents. Peut-être les "microbodies" seraient-ils responsables des phosphorylations améliorées observées dans le cas précédent. Enfin, nous voyons, d'après les Tableaux IX et XII, que l'activité respiratoire reste sensiblement double pour les mitochondries G, par rapport aux mitochondries M, tout en présentant une certaine variabilité. Cette propriété des mitochondries serait donc indépendante du degré de purification des particules.

Nous nous demandons si les mêmes facteurs qui, dans nos préparations, découplent les oxydations phosphorylantes, n'auraient pas une action analogue sur les P:O accumulation. Il a déjà été vérifié que l'oligomycine qui bloque l'incorporation du phosphate minéral au cours des oxydations phosphorylantes n'a pas d'action sur l'accumulation active du phosphate minéral. Par contre, le dicoumarol et le dinitrophénol bloquent cette accumulation, de même qu'ils découplent les oxydations phosphorylantes (82, 103). Rappelons que les rapports P/O des oxydations phosphorylantes et les rapports P:O accumulation sont numériquement identiques. En effet, la translocation ou l'absorption du phosphate minéral constituent un dénominateur commun à l'absorption des cations et aux oxydations phosphorylantes.

Il serait donc intéressant de déterminer également les rapports P:O accumulation de toutes nos préparations et de les comparer aux rapports P/O des oxydations phosphorylantes.

T A B L E A U XIII

Valeur du P/O des mitochondries après une désintégration des cellules hépatiques au moyen du broyeur de POTTER

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	1,86	1,84
2	1,73	2,19
3	1,65	1,77
Moyenne ± E. Standard	1,73 ± 0,10	1,93 ± 0,13

Après l'homogénéisation du foie au moyen du broyeur de Potter. Les mitochondries sont préparées suivant la technique III. Le milieu d'incubation est donné dans le Tableau IV.

T A B L E A U XIV

Valeur du QO_2 pour les mêmes préparations

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
I	28,2 23,4	37,8 41,4
2	26,4 27,6	68,4 63,0
3	31,2 37,2	51,6 52,8
Moyenne ± E. standard	28,9 ± 2,3	52,5 ± 4,8

Les conditions expérimentales sont décrites dans le Tableau IX

T A B L E A U XV

Pourcentage des ARN et des protéines des mêmes préparations

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	2,45	3,06
2	1,58	3,15

Les protéines et les acides ribonucléiques sont dosés sur un aliquot des suspensions qui ont servi à la détermination des oxydations phosphorylantes et de l'activité respiratoire.

4 - Oxydations phosphorylantes des mitochondries M et G après une désintégration des cellules hépatiques au moyen du broyeur de Potter

Dans quelques expériences, nous avons homogénéisé le foie à l'aide du broyeur de Potter et non pas de l'Ultra-Turrax, afin de comparer l'influence de ces deux procédés d'homogénéisation sur les propriétés des mitochondries. Nous les avons ensuite séparées suivant la Technique III qui doit aboutir à des particules purifiées. Nous avons simultanément dosé les ARN et les protéines des deux fractions M et G. Nous avons groupé les résultats dans les Tableaux XIII, XIV et XV.

Ces résultats montrent qu'une simple modification technique a supprimé les différences que nous avions observées jusqu'à présent. Cette fois-ci, nous avons obtenu des P/O satisfaisants, et de même ordre de grandeur pour les deux catégories de particules : nous ne pensons pas, toutefois, que les différences trouvées jusqu'à présent soient imputables à un artefact dû à l'utilisation du broyeur Ultra-Turrax. Nous remarquerons, de plus, que la composition en ARN et en protéines n'est pas la même que celle que nous avions observée jusqu'à présent. Cette fois-ci, les particules G sont plus riches en ARN que les particules M. Les valeurs comprises entre 1 et 2 trouvées pour le P/O peuvent signifier que nous sommes en présence d'un mélange de mitochondries différemment inactivées (27). Or, nos expériences relatives au gonflement mitochondrial ont été faites sur des particules préparées de la même manière. Peut-être est-ce pour cette raison que nous n'avons pas observé de différences significatives entre leurs aptitudes au gonflement ?

TABLEAU XVI

Valeur du P/O des mitochondries préparées dans le saccharose 0,44 M

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	1,24	1,08
2	1,35	1,65
3	1,05	1,27
4	1,05	1,16
5	1,38	1,06
Moyenne ± E. standard	1,21 ± 0,06	1,24 ± 0,10

Les mitochondries ont été préparées dans le saccharose 0,44 M suivant la technique III. Le milieu d'incubation est donné dans le Tableau IV mais la solution de saccharose 0,25 M est remplacée par une solution de saccharose 0,44 M

TABLEAU XVII

Activité respiratoire des mitochondries M et G préparées dans le saccharose 0,44 M

Valeur du QO_2 (en m^3 O2/heure/mg protéines mitochondriales)

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1		35,4
2	29,4 27,6	32,4 38,4
3	30,0 30,1	
4	25,2 25,8	40,2 39,6
5		34,2 38,4
Moyenne ± E. standard	28,8 ± 0,6	36,9 ± 0,7

Les conditions de la détermination du QO_2 sont indiquées dans le Tableau IX. Le milieu d'incubation est donné dans le Tableau XVI

TABLEAU XVIII

Contrôle respiratoire des mitochondries M et G préparées dans le saccharose 0,44 M

N° exp.		Respiration en présence de l'accepteur des liaisons phosphate (1) MM_3 O_2/Minute	Respiration en absence de l'accepteur (2) MM_3 O_2/Minute	Contrôle respiratoire (1) : (2)
2	M	1,63	1,95	0,83
	G	1,59	2,09	0,76
3	M	2,99	0,32	(9,3)
	G	2,98	0	
4	M	2,04	3,09	0,66
	G	3,28	4,68	0,70
5	M	1,01	1,34	0,75
	G	2,08	2,76	0,75

La respiration en présence de l'accepteur des liaisons phosphate est déterminée en incubant les mitochondries dans le milieu décrit dans le Tableau IV.
La respiration en absence de ce système est déterminée en remplaçant dans ce milieu le mélange glucoce + hexokinase par un volume identique de saccharose 0,44 M.

Moyenne ± E. standard : M 0,72 ± 0,04

G 0,71 ± 0,04 (en éliminant les résultats de l'expérience N°3)

5 - Oxydations phosphorylantes de mitochondries préparées dans le saccharose 0,44 M.

Dans cette série d'expériences, nous avons préparé les mitochondries dans le saccharose 0,44 M (suivant la Technique III), ce milieu plus dense préserve en effet davantage la morphologie des particules. Dans ce cas, nous avons prolongé la durée des centrifugations pour tenir compte de cette densité plus élevée du milieu : les mitochondries G ont été sédimentées à 800 g pendant 18 minutes, et les mitochondries M à 9.000 g pendant 27 minutes.

Nous donnons les résultats obtenus au cours de cinq expériences successives sur les Tableaux XVI, XVII et XVIII.

Nous observons que, pour des mitochondries préparées dans le saccharose 0,44 M , la valeur du P/O est identique pour les deux catégories de particules et est abaissée à la valeur la plus faible trouvée dans toutes les expériences précédentes, c'est-à-dire 1,21 pour les particules M et 1,24 pour les particules G. L'activité respiratoire (Tableau XVII) reste plus élevée pour les particules G, mais la différence entre les mitochondries M et G est atténuée. Nous avons aussi déterminé le contrôle respiratoire par le rapport de la respiration en présence et en absence du système accepteur des liaisons phosphate. Nous présentons les résultats sur le Tableau XVIII. Les résultats trouvés nous montrent que la respiration des mitochondries en présence de l'accepteur est de 0,7 fois plus faible qu'en absence de l'accepteur. Or, dans ce dernier cas, l'A T P formé durant les oxydations phosphorylantes n'est pas soustrait des mitochondries par le système accepteur des liaisons phosphate, nous observons donc non pas une inhibition mais une stimulation de la respiration par l'A T P , à l'exception de l'expérience n° 3 où ce rapport élevé montre que les mitochondries sont bien couplées. Mais nous ne nous expliquons pas ce dernier résultat puisque les valeurs du P/O correspondantes sont toujours

T A B L E A U XIX

Oxydations phosphorylantes

de mitochondries de cellules d'ascite

N° Exp.	P/O (déterminé en double pour chaque préparation)		
			Moyenne
1	0,85	0,76	0,805
2	1,1	1,1	1,100
4	0,80	0,91	0,855
5	1,2	1,17	1,185

Moyenne ± E. standard 0,99 ± 0,09

Les mitochondries des cellules d'ascite ont été préparées comme il est dit dans le texte.

Le milieu d'incubation est donné dans le Tableau IV.

voisines de l'unité ; nous l'avons donc éliminé de la moyenne calculée avec les autres résultats. Or, nous avions utilisé le saccharose 0,44 M parce que ce milieu est sensé préserver la morphologie des particules. Il s'avère néanmoins un milieu défavorable pour leur activité respiratoire. En effet, si, d'une part, le saccharose hypertonique inhibe l'activité ATPasique des mitochondries, d'autre part, il est aussi un inhibiteur des oxydations phosphorylantes (30). Ce corps semble, de ce fait, atténuer les différences biochimiques qui se présentent entre les mitochondries lourdes et les mitochondries légères, tout en préservant leur structure.

6 - Oxydations phosphorylantes de mitochondries de cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA

Nous avons déterminé les P/O des mitochondries des cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA préparées suivant la technique décrite. (Ces préparations n'ont pas été contrôlées au microscope électronique). Nous donnons les résultats obtenus dans le Tableau XIX. Les valeurs du P/O sont égales à 1. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par de nombreux auteurs sur des mitochondries de cellules tumorales en utilisant le succinate comme substrat d'oxydation : par exemple, avec des mélanomes amélanotiques de la souris (123), ou l'hépatome de la souris (67). Mais il est en contradiction avec ceux d'ANDREJEW et ROSENBERG (13) qui trouvent un P/O compris entre 1,7 et 1,8 dans le même hépatome ascitique que nous avons utilisé. Il nous faut toutefois insister sur le fait que ces mitochondries ont été préparées à la suite d'un choc osmotique subi par les cellules dans le but de rendre leur membrane plus perméable : un passage de quelques minutes dans l'eau distillée glacée. Or, ce choc peut être susceptible, par lui-même, d'entraîner une altération des mitochondries. Celles-ci, en effet, sont particulièrement fragiles dans un

TABLEAU XX

Comparaison entre les Oxydations et les Phosphorylations mesurées d'une part sur des mitochondries intactes, d'autre part sur des mitochondries débarrassées de leur cytochrome c endogène (mitochondries traitées) : a) sans addition, b) en présence de cytochrome c exogène, c) en présence de catalase

Ier essai

	Mitochondries intactes	Mitochondries traitées		
		sans addition	+ Cyt c	+ catalase
		(a)	(b)	(c)
$\frac{\mu atg\ P/minute}{10\ mg\ protéines}$	2,44	0,40	0,85	0,35
$\frac{\mu atg\ O/minute}{10\ mg\ protéines}$	1,25	0,28	0,82	0,38
P/O	1,94	1,44	1,03	0,92

2ème essai

$\frac{\mu atg\ P/minute}{10\ mg\ protéines}$	2,41	0,24	1,26	0,37
$\frac{\mu atg\ O/minute}{10\ mg\ protéines}$	1,19	0,28	0,97	0,21
P/O	2,02	0,85	1,30	1,80

Les mitochondries intactes ont été préparées suivant la technique III (voir le texte). Les mitochondries traitées ont été débarrassées de leur cytochrome c comme il est indiqué dans le texte.
Le milieu d'incubation est indiqué dans le Tableau IV. Substrat : succinate . concentration du cytochrome c : $2,8 \times 10^{-5}$. Concentration de la catalase : $3,3 \times 10^{-6}$M - température : 28° C.

tissu tumoral. Ainsi, ce découplage partiel pourrait s'expliquer par un dommage mécanique subi par les mitochondries au cours de leur isolement.

Pourant, HAWTREY a aussi remarqué que, avec le succinate, le P/O théorique de 2 n'est jamais obtenu avec des mitochondries de cellules d'ascite. Il pense que le site de phosphorylation compris entre le cytochrome c et l'oxygène est inactif dans ces mitochondries. En effet, en utilisant l'ascorbate comme substrat d'oxydation, c'est-à-dire en limitant le transfert des électrons à l'étape cytochrome c $\longrightarrow O_2$, il n'a pas obtenu de phosphorylation couplée à la respiration (58).

Nous pensons, quant à nous, qu'il serait très intéressant de déterminer le P:O <u>accumulation</u> correspondant, puisqu'il est toujours numériquement égal au rapport P/O des oxydations phosphorylantes chez des mitochondries normales.

7 - <u>Oxydations phosphorylantes des mitochondries débarrassées de leur cytochrome c endogène</u>

Nous nous sommes intéressée à une hypothèse de MANOÏLOV qui attribue à la catalase un rôle de base dans les oxydations phosphorylantes en relation avec le cytochrome c (88) : après avoir débarrassé les mitochondries de leur cytochrome c endogène, il a observé une baisse brutale des oxydations et des phosphorylations déterminées avec le glutamate comme substrat d'oxydation. Ces deux activités sont partiellement restaurées en présence de cytochrome c exogène. Or, en présence de catalase, seules les phosphorylations restent améliorées. Il s'en suit une élévation du rapport P/O qui atteint la valeur obtenue avec des mitochondries intactes. Nous avons cherché à vérifier si le même phénomène se produisait avec des mitochondries préparées suivant notre technique et en utilisant le succinate comme substrat d'oxydation. Nous présentons dans le tableau XX le résultat de deux expériences. Il en ressort que les phosphorylations et les oxydations de mitochondries traitées (débarrassées du cytochrome c endogène) sont très abaissées et restent

du même ordre de grandeur en présence comme en absence de catalase. Les fluctuations du rapport P/O observées sont alors imputables aux valeurs très faibles des oxydations et des phosphorylations mesurées. Dans d'autres expériences nous avons constaté une suppression totale des oxydations et des phosphorylations des mitochondries traitées, sans influence de la catalase. Il ressort que, dans le cas de mitochondries préparées suivant notre technique, avec le succinate comme substrat d'oxydation, une participation directe de la catalase aux oxydations phosphorylantes n'est pas évidente.

II - TENEUR EN EAU DES MITOCHONDRIES

Dans cette série d'expériences, les mitochondries ont été successivement préparées suivant les techniques I et II. Les culots M et G une fois séparés ont été remis deux fois en suspension dans une solution de KREBS-RINGER et centrifugés à 26.000 g 20 minutes, de manière à obtenir des culots compacts, tout comme dans les expériences qui ont servi à déterminer la répartition des ions entre les milieux liquides intra et extra-particulaires (121). De plus, ils ont été totalement débarrassés du saccharose dans lequel ils avaient été préparés. Nous avons effectué ces expériences sur des mitochondries en suspension dans la solution de KREBS-RINGER. Ce milieu est considéré comme un milieu plus physiologique que la solution de saccharose isotonique, il est équilibré et de composition ionique analogue à celle du sérum (29). Nous discuterons à la fin de ce paragraphe de la signification à donner aux résultats obtenus dans ce milieu.

Pour appliquer la technique de dilution isotopique, nous avons choisi l'ADP-^{14}C comme molécule marquée parce que l'on pensait que ce nucléotide ne pénétrait pas dans les mitochondries (121) et aussi parce qu'il a une action stabilisatrice sur la structure des particules (32).

TABLEAU XXI

Comparaison entre le volume de dilution de l'ADP ^{-14}C par l'eau interparticulaire du culot de mitochondries, et l'eau totale du culot

N° exp.		Vol. de la solution d'ADP ajoutée V (ml)	Radioactivité ajoutée (par unité de volume) c/min/ml A	Radioactivité du surnageant (par unité de volume) c/min/ml B	Volume liquide interparticulaire $x = V \frac{(A-B)}{B}$ ml	Eau totale du culot déterminée par dessication g
1	M	0,100	1.015,2	41,2	2,3460	0,7920
	G	0,100	2.030,4	166,4	2,2403	1,6670
2	M	0,100	13.568	1.410,5	0,8570	0,8550
	G	0,100	13.568	1.704,8	0,6930	0,6478
3	M	0,400	5.508	1.905,2	0,7562	0,6842
	G	0,400	5.508	2.636	0,4342	0,4109

Les mitochondries ont été lavées à deux reprises dans une solution de RINGER et mises en suspension dans une solution d'ADP radioactif, dilué dans de l'ADP non radioactif à 16 mg/ml dans la solution de RINGER.
La radioactivité a été mesurée sur la solution initiale et sur la solution surnageante après une centrifugation de la suspension à 26.000 g pendant 20 minutes.

TABLEAU XXII

Teneur en eau des mitochondries

	MITOCHONDRIES M					MITOCHONDRIES G			
N° exp.	Poids des mitochondries fraiches g	Poids d'eau intramitochondriale g	Teneur en eau %	écart	N° exp.	Poids des mitochondries fraiches g	Poids d'eau intramitochondriale g	Teneur en eau %	écart
I	0,4197	0,3111	74,1	2%	1	0,7892	0,6628	84,0	1%
	0,2904	0,2112	72,7			0,9051	0,7693	85,0	
2	0,5149	0,410			2	0,4035	0,3237	80,2	0,9%
	0,3315	0,2430	73,3			0,2978	0,2409	80,9	
					3	0,2631	0,2226	84,6	2%
						0,4006	0,3320		
4	0,1440	0,1121	77,8	3%					
	0,1726	0,1385	80,2						
5	0,2297	0,1560	67,9	3%	5	0,2386	0,1815	76,1	0,9%
	0,1763	0,1174	66,3			0,2339	0,1764	75,4	
Moyenne ± E. standard			73,2 ± 2,1					81,1 ± 1,4 (dessication)	

L'eau intramitochondriale des culots est déterminée par différence entre l'eau totale de ces culots et l'eau intermitochondriale (dilution isotopique). Le poids des mitochondries fraîches est déterminé en retranchant du poids frais du culot le poids de l'eau intermitochondriale plus celui des sels dissous dans cette dernière.

1 - Expériences préliminaires

Dans une première série d'expériences, nous avons déterminé le volume liquide interparticulaire par la technique que nous avons décrite et nous l'avons comparé au volume de l'eau totale contenue dans le culot, déterminé par dessication. Nous groupons les résultats sur le Tableau XXI.

Ces résultats nous montrent que le volume de dilution de l'ADP radioactif ainsi déterminé, et qui doit correspondre au volume liquide interparticulaire,est supérieur au volume de l'eau totale contenue dans le culot de mitochondries. Ceci ne peut s'expliquer qu'en admettant qu'une fraction de l'ADP radioactif a été non pas diluée par l'eau interparticulaire mais soustraite du milieu liquide par les particules soit par adsorption, soit par pénétration véritable. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons tenu compte de cette quantité d'ADP radioactif fixé par les mitochondries.

2 - Teneur en eau des mitochondries

En tenant compte de cette quantité d'ADP radioactif fixé par les particules, nous avons obtenu les résultats consignés sur le Tableau XXII.

Les chiffres obtenus nous montrent que notre technique nous permet de déterminer la teneur en eau des mitochondries avec une précision satisfaisante. Pour chaque préparation, nous avons effectué deux fois cette détermination et l'écart observé entre les deux résultats est inférieur à 3 %.

Il ressort de ces résultats que les deux catégories de particules diffèrent par leur teneur en eau de façon significative :

- pour les particules M, la teneur en eau, exprimée en pourcentage, est de 73,2 $\pm$ 1,8
- pour les particules G, cette teneur est de 81,1 $\pm$ 1,3

L'écart observé est nettement supérieur à la précision obtenue en répétant ces déterminations deux fois. Il faut en conclure que les mitochondries G ont été fixées dans un état de gonflement nettement plus marqué.

Les déterminations qui nous ont conduite à ce résultat ont été faites dans la solution de KREBS-RINGER. Ce milieu est essentiellement constitué de Na Cl , mais il contient également les ions $H_2P\ O_4^-$ et Ca^{++} à des concentrations respectives de 1,41 mM et 2,9 mM (Tableau VI). A ces concentrations, ces ions sont des promoteurs énergiques du gonflement des mitochondries. Mais la solution de KREBS-RINGER contient également Mg^{++} à une concentration de 1,41 mM. Or, on sait qu'à cette concentration, l'ion Mg^{++} inhibe énergiquement ce gonflement (113). L'équilibre obtenu, et qui nous a livré les résultats exposés, est donc dû à la résultante de ces forces opposées.

Par des méthodes optiques, dont nous reparlerons (étude dynamique du gonflement), nous avons cherché à vérifier ce fait. Nous avons suivi avec l'appareil d'EPPENDORF les variations de volume subies par les mitochondries M et G en suspension dans le saccharose 0,25 M, lorsque ces suspensions sont introduites dans la solution de RINGER, la température étant maintenue à 0°C. A ce moment, les particules subissent un gonflement qui aboutit à un nouvel état d'équilibre, caractérisé par un palier de la courbe représentant la variation de densité optique (à 546 mμ) en fonction du temps.

Mais si ces mêmes particules (en suspension dans le saccharose 0,25 M) sont introduites directement dans la solution de RINGER contenant, en plus, de l'ADP à 16 mg/ml (concentration utilisée pour déterminer leur teneur en eau statique), les courbes figuratives marquent une légère hausse de la densité optique (correspondant à une légère contraction), puis présentent un palier. Il semble que, dans ces conditions, les mitochondries ne subissent pas de variation de volume mesurable.

T A B L E A U XXIII

Teneur en eau des mitochondries en présence de traces de Saccharose

N° Exp.	Mitochondries "M"	écart	Mitochondries "G"	écart
N° 1	77,0 78,5	2%	78,7 77,7	1,5 %
N° 2	81,8 31,3	0,6%	75,9 73,3	3,2 %

Les conditions expérimentales sont indiquées dans le TABLEAU XXII mais l'eau intermitochondriale est déterminée par la technique de dilution isotopique en utilisant le saccharose radioactif comme molécule marquée.

T A B L E A U XXIV

Comparaison entre la teneur en eau des mitochondries M et G

N° Exp.	a) déterminée avec l'ADP ^{14}C		b) déterminée avec le sucrose ^{14}C	
	Mitochondries M	Mitochondries G	Mitochondries M	Mitochondries G
1	75,3) 78,4) 76,8	72,6) 70,1) 71,3		
2			78,7	78,9
3			82,3	80,1
4	72,1	69,7	78,0	77,5
5	73,7	79,9	72,7	77,9
6		74,9		74,7
7		74,7	69,5	75,3
8	59	69	71	
9	58,9	62	72,9	73,5
10	72,4) 75,4) 73,9	79,5) 79,4) 79,5		
Moyenne ± erreur standard	70,6 ± 2,7	73,2 ± 1,7	75,0 ± 1,8	76,8 ± 0,6

La détermination de la teneur en eau est effectuée comme sur le Tableau XXII mais le poids de l'eau intermitochondriale est déterminé par la technique de dilution isotopique en utilisant, pour une même préparation de mitochondries, soit l'ADP soit le saccharose, comme molécule marquée.
Les mitochondries ont été préparées suivant la technique II.

Il s'en suit que la teneur en eau des mitochondries dans une solution de RINGER contenant de l'ADP à 16 mg/ml correspondrait à celle de mitochondries isolées dans le saccharose 0,25 M.

Cependant, nous avons tenu à déterminer également la teneur en eau des mitochondries M et G en utilisant une autre molécule marquée. Nous avons pour cela repris exactement le même procédé que ci-dessus, mais en utilisant du saccharose -^{14}C, toutes autres conditions restant identiques : les particules sont toujours dans la solution de RINGER contenant de l'ADP non radioactif à 16 mg/ml, mais à laquelle nous avons ajouté du saccharose -^{14}C à l'état de traces (pour obtenir une radioactivité de 1 000 coups/min. dans un volume de 100µl).

Le résultat de deux expériences semblables est résumé dans le Tableau XXIII.

Nous voyons que, pour chaque détermination faite deux fois, l'écart des résultats est de nouveau inférieur à 3 %. Mais on n'observe plus les mêmes différences entre les deux catégories de particules : dans la première détermination, les deux populations présentent la même teneur en eau ; dans la seconde, les résultats sont inversés par rapport aux précédents, c'est-à-dire que ce sont les mitochondries M qui sont les plus gonflées. Or, la seule différence avec les déterminations précédentes réside dans la présence du saccharose à l'état de traces.

C'est pourquoi nous avons ensuite comparé les résultats obtenus par notre méthode en déterminant, pour une même préparation de mitochondries, la teneur en eau en utilisant, d'une part, l'ADP-8-^{14}C , d'autre part le saccharose -^{14}C (Tableau XXIV)

Nous remarquerons que, pour une même préparation de mitochondries, les résultats sont différents suivant que l'on détermine la teneur en eau avec l'ADP-^{14}C ou le saccharose-^{14}C à l'état de traces dans le même milieu.

Ici, nos résultats rejoignent ceux de LEHNINGER : en effet, il a constaté que le saccharose était un inhibiteur de multiples réactions de gonflement des mitochondries, par exemple le gonflement induit par la thyroxine ou la contraction provoquée par l'ATP (81). Cette action inhibitrice pourrait justement expliquer le rôle protecteur du saccharose sur la structure des mitochondries au cours de leur isolement : elles seraient en quelque sorte "fixées" (81).

Nous pensons que le saccharose, même présent à l'état de traces, modifie l'équilibre complexe atteint par les mitochondries sous l'influence simultanée des ions constituant la solution de RINGER, et de l'ADP.

3 - Pénétration partielle des mitochondries par le saccharose

Les mitochondries placées dans une solution d'un corps non pénétrant se comportent comme un osmomètre et suivent la loi de BOYLE et VANT'HOFF : la variation de leur volume est inversement proportionnelle à la variation de la pression osmotique de la solution (114).

Pour certains auteurs, il existe une contradiction entre ce comportement osmotique des mitochondries, et leur perméabilité au saccharose, qui devrait supprimer ce comportement osmotique (65). Cette contradiction est levée si l'on admet, soit une perméabilité partielle des mitochondries au saccharose, soit l'existence de deux catégories de particules, les unes perméables au saccharose, les autres imperméables (12). Nous avons cherché à vérifier ces hypothèses. En effet, cette même technique nous permet de déterminer la fraction du volume mitochondrial dans laquelle a pénétré le saccharose.

Pour : B = radioactivité par unité de volume du milieu liquide après centrifugation (après la mise en contact avec les particules), V_l = volume liquide intramitochondrial

T A B L E A U XXV

Fraction du volume mitochondrial pénétré par le saccharose exprimée en pourcentage par rapport à l'eau intramitochondriale

N° Exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	12,9 9,2	17,3 17,7
2	25,8 32,8	19,9
3	16,0	10,5
4	16,3	21,3
5	46,5	27,0
6	22,9	20,3
7	50,8	30,8

Les conditions expérimentales sont données dans le Tableau XXIV.
Le volume liquide pénétré par le saccharose, V_l , est donné par le rapport C/B, pour C=radioactivité fixée par les mitochondries, B=radioactivité par unité de volume du milieu liquide surnageant après la centrifugation.
La fraction du volume liquide mitochondrial pénétré par le saccharose est donnée par le rapport V_l : eau intramitochondriale.

T A B L E A U XXVI

Coefficient de tassement des particules
exprimé par le pourcentage de l'eau intermitochondriale à l'eau totale des culots. A) en utilisant l'ADP -^{14} C

N° Exp.	Mitochondries M	Mitochondries G
1	41,3 45,4	24,1 14,1
2	30,7 47,3	21,0 24,1
3	44,1 35,1	
4	62,8 65,0	45,9 47,2
Moyenne ± E. Standard	46,4 ± 4,2	29,4 ± 6,2

L'eau intermitochondriale des culots est calculée comme il est indiqué dans le Tableau XXII ; l'eau totale des mêmes culots est déterminée par la méthode de dessication.

pénétré par le saccharose (à déterminer), et C_1 = radioactivité totale de la suspension faite avec le culot, en admettant que la concentration du saccharose est identique, dans le milieu intérieur pénétré et dans le milieu extérieur, en l'absence de gradient, on a $B = \frac{C_1}{V_1}$ d'où l'on peut calculer V_1 . La fraction liquide mitochondriale pénétrée par le saccharose est ensuite donnée par le rapport (V_1 : eau intramitochondriale). Nous avons alors obtenu les résultats consignés dans le Tableau XXV.

Ces résultats irréguliers ne permettent pas de tirer de conclusions quantitatives précises. Mais, de même que pour la teneur en eau déterminée en présence de saccharose, ce dernier corps semble inhiber l'équilibre atteint par les particules. D'autre part, la perméabilité au saccharose est certainement modifiée par le gonflement subi par les particules dans la solution de RINGER, même après leur stabilisation par l'ADP. Cette même technique appliquée à des particules en suspension dans une solution de saccharose pur, donc relative à un équilibre moins complexe, pourra donner d'utiles renseignements sur la perméabilité plus ou moins partielle des mitochondries au saccharose.

4 - Tassement des particules

Les deux catégories de particules sont obtenues après une centrifugation de 26.000 g pendant 20 minutes. Si on les assimile à des sphères empilées, la fraction liquide interparticulaire correspondra à l'espace compris entre ces sphères et donnera une idée de leur tassement dans ces conditions de centrifugation. C'est pourquoi nous avons calculé le coefficient de tassement des particules par le rapport de l'eau interparticulaire à l'eau totale du culot.

En utilisant l'ADP-^{14}C comme molécule marquée, nous avons obtenu les résultats donnés par le Tableau XXVI .

T A B L E A U XXVII

Coefficient de tassement des mitochondries exprimé par le pourcentage de l'eau intermitochondriale à l'eau totale du culot

B) en présence de Saccharose à l'état de traces

N° Exp.	Particules M	Particules G
1	52,4 47,9	45,0 48,3
2	48,4	43,4
3	41,8	50,3
4	50,0	54,0
5	66,2	57,2
6	58,2	64,5
Moyenne ± E. Standard	52,1 ± 3	51,4 ± 2,2

L'eau intermitochondriale des culots est déterminée comme sur le Tableau XXIII.
L'eau totale des culots est déterminée par dessication.

Nous voyons donc que ce coefficient présente une différence significative entre les deux catégories de particules et permettrait de les distinguer suivant leur dimension, leur configuration et leur comportement à la centrifugation.

D'autre part, lorsque nous déterminons ce même coefficient de tassement, mais en utilisant le saccharose comme molécule marquée, nous trouvons que ces différences sont très atténuées au point que le tassement paraît être identique pour les deux catégories en particules M et G (Tableau XXVII).

Ainsi, en présence de saccharose à l'état de traces, les mitochondries auraient, d'une part, une même teneur en eau, d'autre part, un empilement identique. Nous expliquons ce fait comme précédemment, c'est-à-dire par une "fixation" de l'état des particules par le saccharose qui modifie leurs réactions de gonflement.

L'objection générale que LEHNINGER présente à la méthode gravimétrique (78) réside, d'une part, dans sa lenteur et dans son utilisation limitée aux états d'équilibre et, d'autre part, par le fait que la centrifugation par elle-même tasse les particules et modifie leur volume. Cette méthode donne néanmoins des renseignements sur l'état d'hydratation des mitochondries à l'équilibre et gagne à être recoupée par la méthode dynamique des variations rapides du volume des particules sous l'influence de différents facteurs.

III - REACTIONS DE GONFLEMENT DES DEUX POPULATIONS MITOCHONDRIALES

Nous montrons les courbes que nous avons obtenues au cours de plusieurs expériences successives en suivant le gonflement présenté par les particules lorsqu'elles sont mises en présence de quelques promoteurs classiques de leur gonflement.

Nous ne sommes pas parvenue, cette fois-ci, à obtenir des courbes présentant une allure suffisamment significative.

En particulier, le gonflement n'atteint jamais l'ampleur indiquée par LEHNINGER (81 , 80).

D'autre part, nous n'avons pas obtenu, en présence de l'ATP, une contraction suffisamment forte, alors que celle-ci doit entraîner le retour des particules à leur volume initial(76). Toutefois, nous avons relevé quelques différences entre les réactions présentées par les deux catégories de particules.

1 - Gonflement induit par la thyroxine (Fig. 1 & 2)

Nous avons remarqué que les particules "M" sont peu réactives vis-à-vis de l'hormone. Les courbes représentant la variation de la densité optique, en fonction du temps, en présence et en absence de thyroxine sont très voisines. De plus, l'addition de l'ATP n'entraine pas d'augmentation de la densité optique. Donc, ce nucléotide ne paraît pas provoquer de contraction.

Le gonflement subi par les particules "G" paraît plus important et l'addition de l'ATP entraîne une légère augmentation de la densité optique.

Nous avons, de plus, cherché quelle serait l'influence de l'ATP lorsque son introduction dans le milieu précède celle des particules, c'est-à-dire le déclenchement du gonflement.

Nous avons obtenu ainsi, deux fois, des résultats intéressants pour les particules G (fig. 2). Celles-ci subissent d'abord un gonflement notable : en dix minutes la densité optique est descendue à la moitié de sa valeur initiale ; ensuite, elle augmente à nouveau. Donc il y a eu contraction spontanée des particules et tout se passe comme si la contraction induite par l'addition de l'ATP ne se produit que lorsque le gonflement a déjà atteint une certaine amplitude ; cette contraction paraît ainsi indépendante de la séquence d'addition de l'ATP. Nous n'avons pas obtenu de réaction analogue avec les particules M.

2 - Influence de l'insuline sur le gonflement des particules (fig. 3)

Nous avons remarqué que les deux catégories de particules gonflent en présence de l'hormone et se recontractent sous l'influence de l'ATP. Toutefois, le gonflement présenté par les particules G paraît précédé d'un temps de latence et est plus accentué que celui présenté par les particules M.

3 - Influence du glutathion sur le gonflement des particules (fig. 4)

Nous savons que ce type de gonflement n'est pas inhibé par le saccharose (83). Nous avons donc étudié l'influence du glutathion dans le saccharose 0,25 M et dans le KCl isotonique. Nous avons remarqué que, dans les deux cas, ce gonflement est très énergique, et plus important dans le KCl. Il est inhibé par l'ATP, lorsque ce nucléotide est présent initialement dans le milieu. Par contre, l'inversion de ce gonflement ne se produit pas en présence d'ATP : il dépend directement de la séquence d'addition du nucléotide.

Dans toutes ces expériences, nous avons remarqué que ce gonflement, dans le saccharose, est précédé d'un temps de latence pour les particules M.

Peut-être pouvons-nous en conclure que les particules G ont déjà été attaquées *in vivo* par le glutathion présent dans le milieu cytoplasmique, et correspondraient à des mitochondries physiologiquement plus âgées ?

4 - Conclusion

Nous avons relevé de très faibles différences entre les propriétés de gonflement des populations mitochondriales M et G . Toutefois, dans ces expériences, les mitochondries ont été séparées après une désintégration de la cellule hépatique au moyen de l'appareil de Potter et non de l'Ultra-Turrax. Or, nous avons vu que, dans ces conditions, la composition des deux fractions n'était pas la même que dans les cas précédents. Nous avons également vu que les oxydations phosphorylantes sont alors voisines pour les deux catégories de particules. Nous expliquons de la même manière la faible différence trouvée entre les propriétés de gonflement des particules M et G.

En outre, nous n'avons pas suivi les réactions de gonflement suffisamment longtemps. Ainsi, ARCOS (14) détermine toujours le pourcentage du gonflement provoqué au bout de 40 minutes et LEHNINGER (80) étudie le gonflement induit par l'insuline pendant 60 minutes. L'inversion de ces différents gonflements, de plus, est toujours plus active si l'on utilise, non pas l'ATP seul, comme nous l'avons fait, mais le mélange : ATP + Mg^{++} + sérumalbumine (76).

Nous pouvons toutefois remarquer que la fraction de mitochondries légères M présente une aptitude plus faible au gonflement. Or, elle est constituée à la fois de mitochondries légères et de particules submitochondriales. Il serait donc intéressant de les séparer et de voir quelles seraient les réactions de gonflement de ces particules isolées et purifiées.

Milieu réactionnel :

1,9 ml KCl 0,15 M pH 7,4 + thyroxine 10^{-5} M
au temps 0 on introduit 0,1 ml de la suspension de mitochondries, la flèche verticale indique le moment de l'addition de l'ATP 3 x 10^{-3} M.

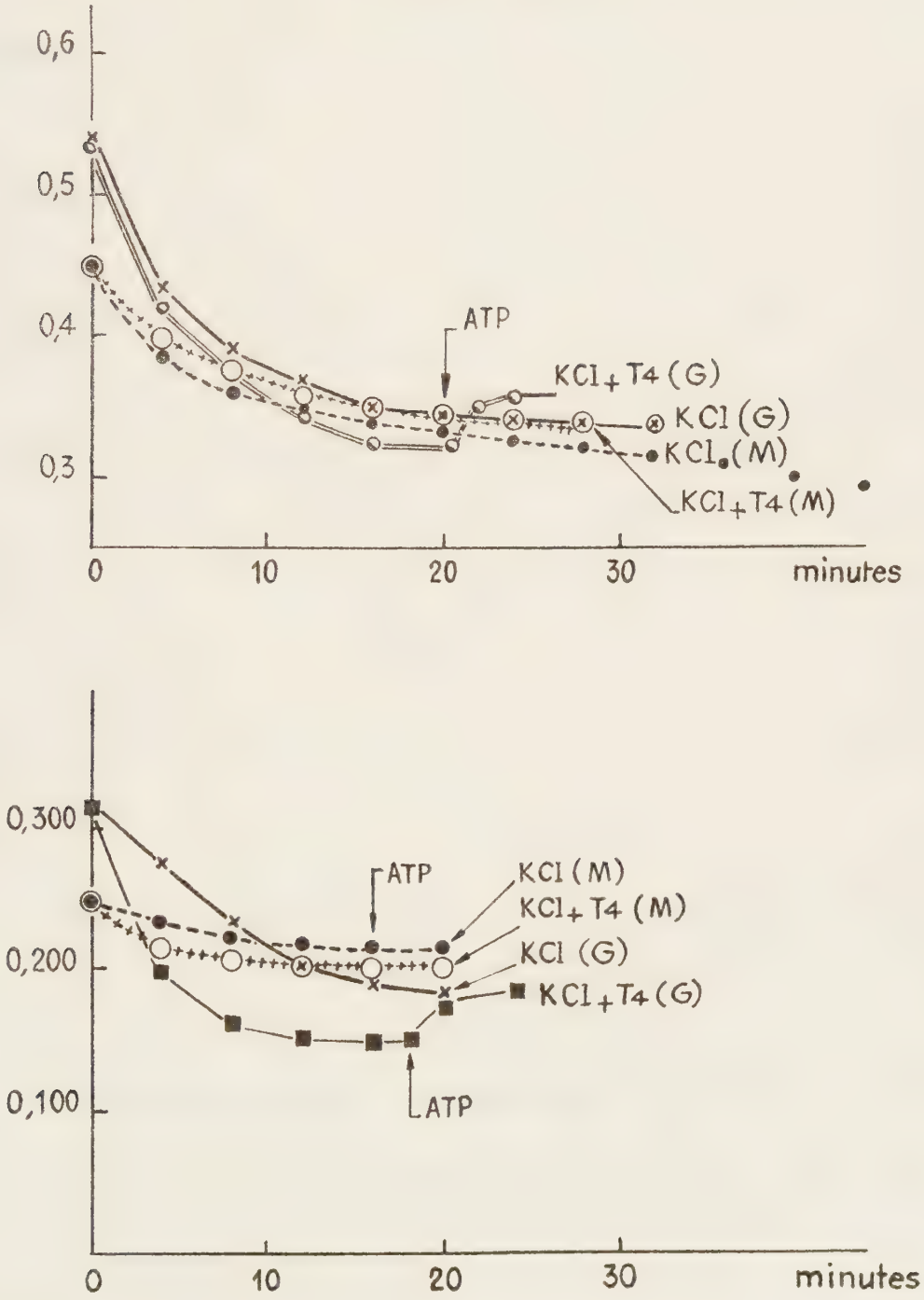


fig. 1

Gonflement des particules G et M en présence de thyroxine (T4)

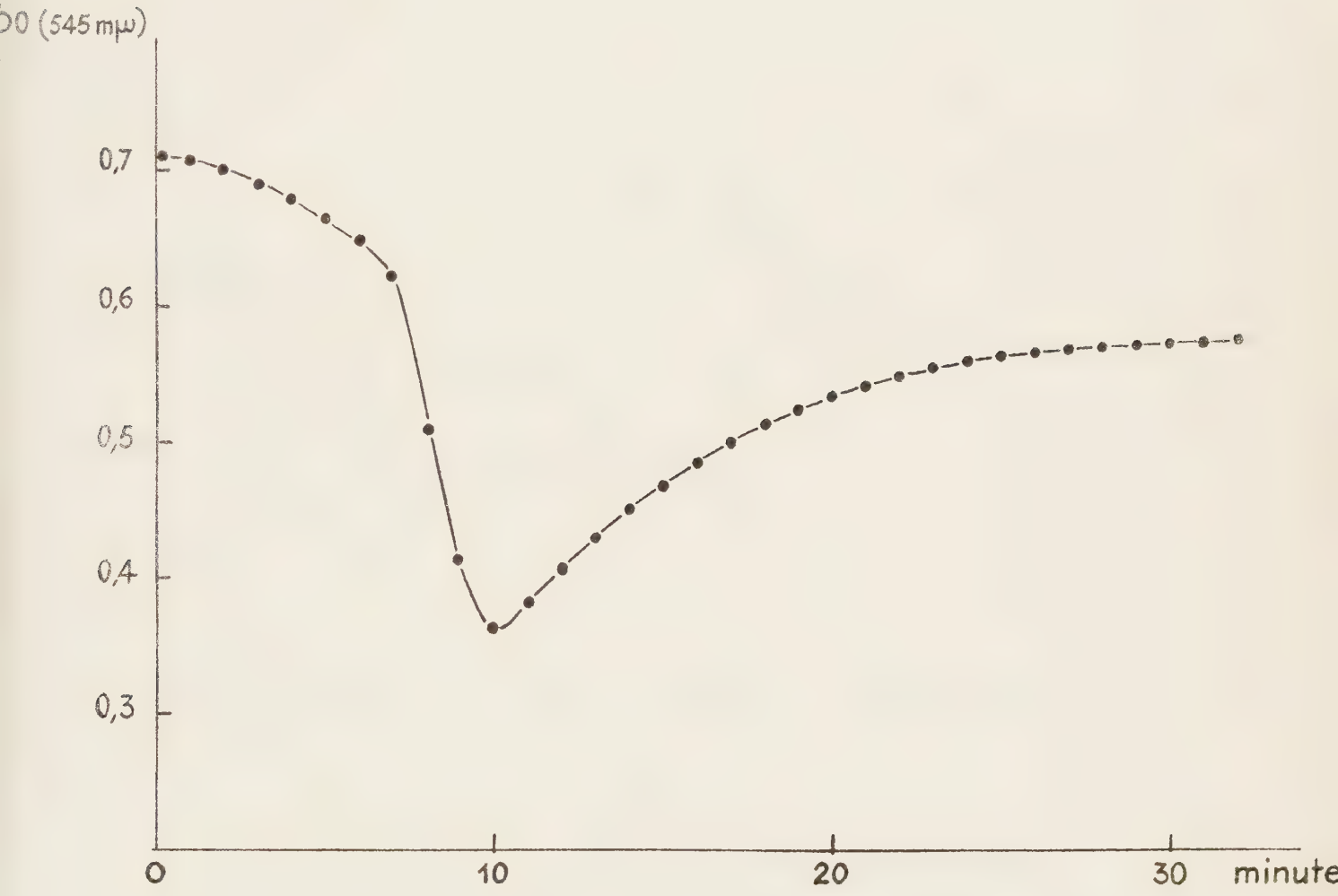


fig. 2

Gonflement subi par les particules G en présence de thyroxine et d'ATP

Milieu réactionnel : identique à celui de la Fig. 1
mais l'ATP 3×10^{-3} M est présent initialement dans Milieu.

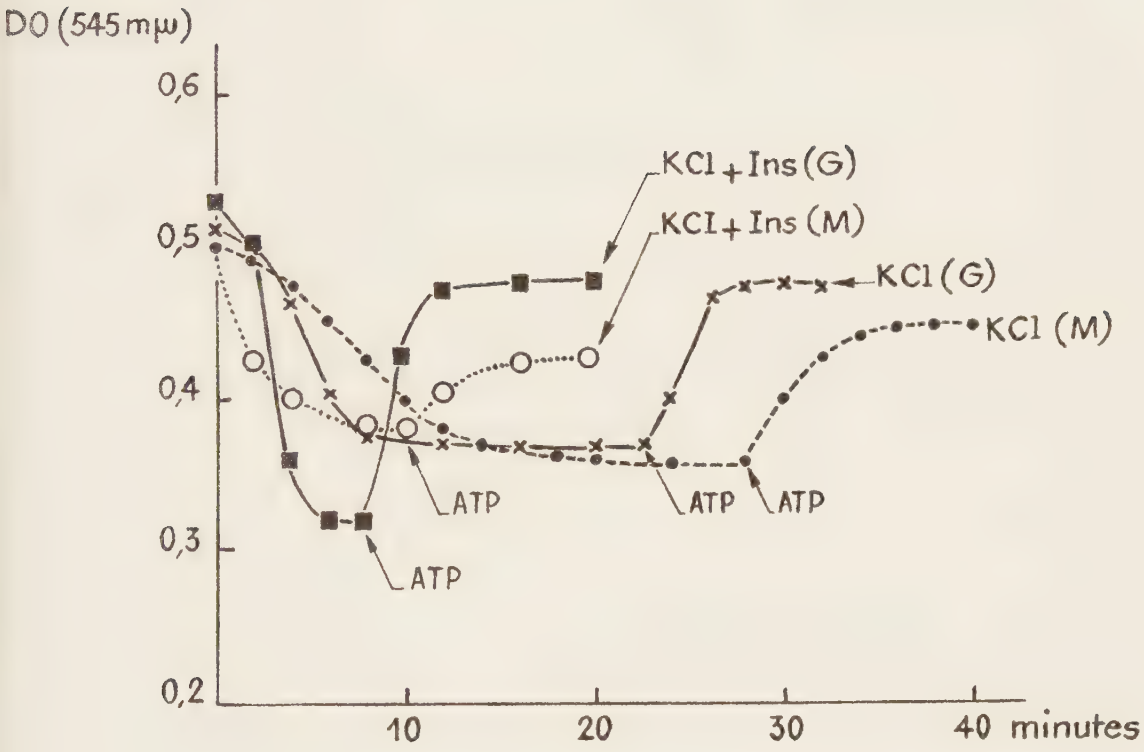


fig. 3

Gonflement des particules G et M en présence d'Insuline

Conditions expérimentales : identiques à celles de la fig. (1) mais la thyroxine est remplacée **par l'insuline** $0,3 \times 10^{-6}$ M

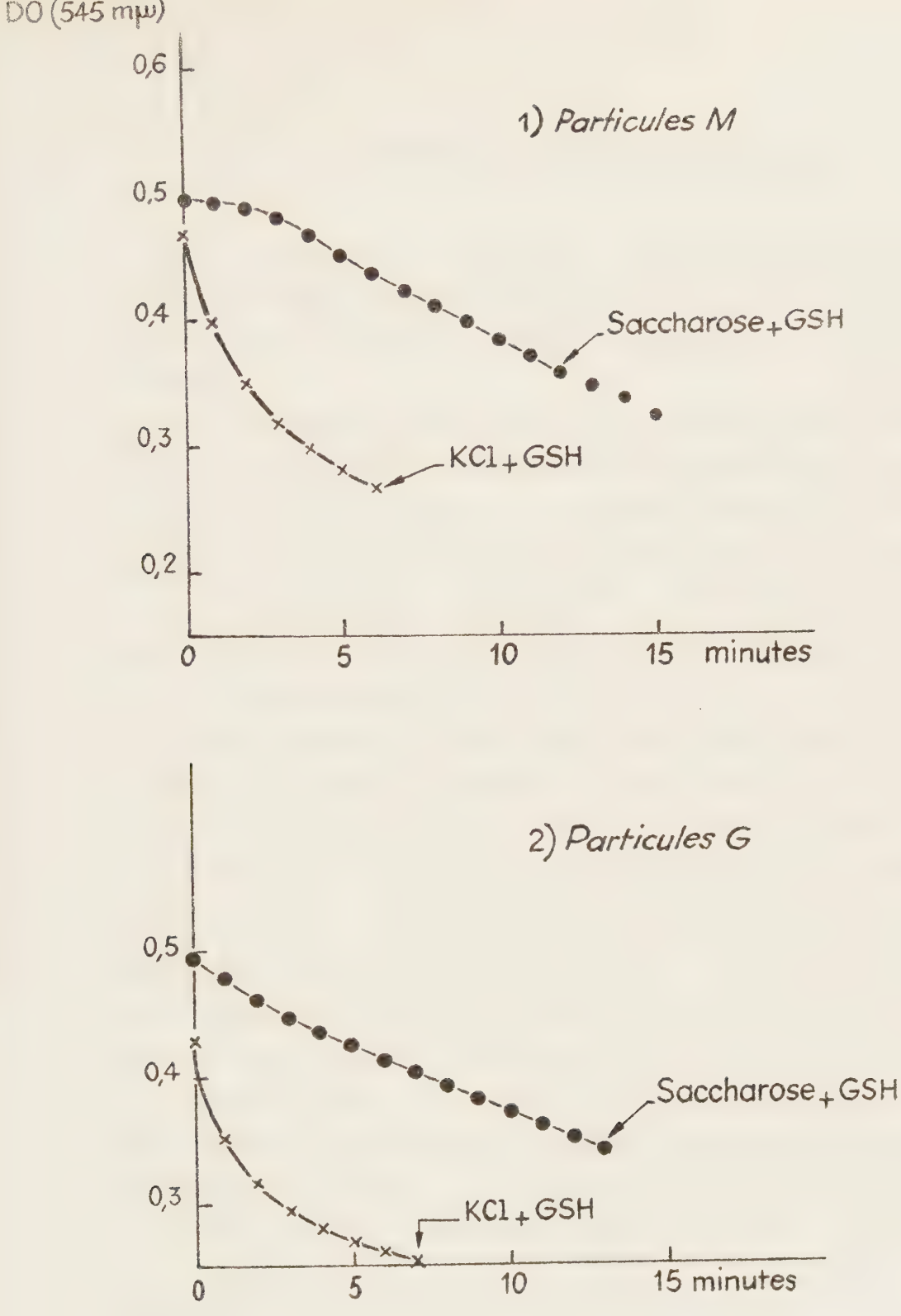


fig. 4

Gonflement des particules M et G en présence de Glutathion

Conditions expérimentales : identiques à celles de la Fig. (1)

Milieu réactionnel : saccharose 0,25 M ou KCl 0,15 M, pH 7,4 contenant le glutathion 0,01 M

DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE

Dans cette première partie de notre travail, nous avons étudié plusieurs propriétés des mitochondries de foie de rat normal, propriétés liées à l'état de la membrane mitochondriale.

Nous avons commencé par séparer deux populations par la force de gravité, obtenant des mitochondries lourdes (G) et des mitochondries légères (M). Ces deux sortes de mitochondries sont accompagnées par des particules submitochondriales : lysosomes, "microbodies", microsomes, en quantités variables.

Nous avons déterminé, dans des conditions variées, les oxydations phosphorylantes des populations mitochondriales M et G accompagnées de ces particules, en utilisant le succinate comme substrat d'oxydation. Nous nous sommes aperçue que le rapport P/O obtenu différait, d'une part, entre les deux populations mitochondriales, et, d'autre part, suivant les techniques de préparation et le degré de purification des particules.

Ainsi, le saccharose hypertonique s'avère-t-il un milieu favorable à la préservation de leur structure mais non à celle de leur activité respiratoire. De plus, dans ce milieu on n'observe plus de différences entre les mitochondries lourdes et les mitochondries légères et la valeur du rapport P/O se rapproche de 1, la valeur la plus faible ayant été trouvée dans d'autres expériences. Or, d'après CHANCE, une valeur intermédiaire entre 1 et 2 indique que l'on se trouve en présence d'un mélange de mitochondries plus ou moins inactivées (27).

En modifiant la technique de broyage des cellules hépatiques, sans changer la technique de préparation des mitochondries, nous avons également remarqué que la différence entre les mitochondries M et G n'apparaît plus. Mais, dans ce cas, nous pensons avoir obtenu des préparations de composition

différente ; cependant, les mitochondries semblent alors moins découplées.

Dans un seul cas, en purifiant les mitochondries "lourdes" suivant une technique personnelle, nous avons obtenu des rapports P/O correspondant à la valeur théorique, c'est-à-dire égaux à 2.

Nous n'avons pas réussi à séparer les mitochondries légères des particules submitochondriales qui les accompagnent, c'est pourquoi les valeurs du P/O reflètent les multiples interférences possibles. Pourtant, le P/O des préparations enrichies en "microbodies" paraît nettement meilleur, se rapprochant de 2, et nous nous demandons quelle pourrait être la participation des "microbodies" aux oxydations phosphorylantes. On sait, en effet, que ces derniers contiennent la catalase. Or, celle-ci participe aux oxydations phosphorylantes par un mécanisme encore mal connu (27), de même qu'elle intervient dans le cycle de gonflement et de contraction des mitochondries (94).

Nous avons également étudié les oxydations phosphorylantes de mitochondries provenant de cellules tumorales et nous avons constaté que, dans ce cas, l'un des deux sites de phosphorylation était inactif.

Nous avons déterminé, dans une série d'expériences, le rapport P : O accumulation, de nos deux catégories de particules et nous avons alors trouvé que les mitochondries légères accumulent nettement plus le phosphate et, par conséquent, aussi le calcium qui suit passivement le phosphate au cours du transport actif de ce dernier (103). Nous avons aussi obtenu la même valeur des rapports P:O accumulation et P/O des oxydations phosphorylantes pour des préparations obtenues dans des conditions de centrifugation identiques.

Nous avons étudié la teneur en eau de nos deux catégories de particules, et avons trouvé que la fraction "lourde"

était constituée de particules nettement plus gonflées et plus tassées. Nous avons vérifié que cet état de gonflement dans un milieu salin, en présence d'ADP, correspondait à l'état de gonflement des particules lorsqu'elles sont en suspension dans la saccharose isotonique. Pourtant, nous nous sommes aperçue que le saccharose à l'état de trace semblait modifier l'état d'équilibre atteint par les particules, lorsque ces dernières sont soumises à l'influence antagoniste de différents ions et de l'ADP.

Nous avons recherché les réactions de gonflement des mitochondries M et G, lorsqu'elles sont mises en présence de quelques promoteurs usuels du gonflement . Des résultats préliminaires semblent indiquer que les particules légères sont moins réactives. Or, elles sont accompagnées de"microbodies"qui, on le sait déjà, sont perméables au saccharose et, par conséquent, ne subissent pas de gonflement passif (18).

Cette étude serait donc à reprendre sur toutes les particules mises en jeu dans nos expériences : mitochondries lourdes et légères, lysosomes et "microbodies". Mais il serait nécessaire d'obtenir auparavant des préparations très pures, pour chaque classe de particules. Les "microbodies" nous paraissent présenter un intérêt particulier, étant susceptibles de participer aux oxydations phosphorylantes.

Nous sommes persuadée que l'étude de l'évolution de toutes ces propriétés importantes, au cours de la cancérisation, devrait apporter des renseignements intéressants sur le rôle des mitochondries et des autres particules submitochondriales dans ce processus. Ainsi, d'après HAWTREY, les mitochondries de cellules d'ascite ont un site de phosphorylation découplé (58). Or, ce sont des mitochondries provenant exclusivement de cellules tumorales. Il serait donc intéressant de vérifier si un découplage analogue se produit au cours du développement d'un hépatome, et à quelle étape du processus.

Toutefois, pareille étude n'a de signification que si l'on arrive d'abord à préparer, aux différentes étapes de la cancérisation, des particules très purifiées. Or, nous nous sommes aperçue qu'une technique de fractionnement de la cellule hépatique, satisfaisant dans le cas d'un foie de rat normal, aboutissait à une séparation assez arbitraire des différents constituants cellulaires dans un organe en voie de cancérisation.

Dans une cancérisation expérimentale du foie de rat, nous avons suivi l'évolution de la catalase hépatique. Tout au long de cette étude, nous avons tracé les diagrammes de distribution de l'enzyme, selon de DUVE (35), et nous nous sommes aperçue qu'ils ne correspondaient pas à une séparation satisfaisante des différentes fractions cellulaires.

Ces recherches ont toutefois donné des renseignements intéressants,tant sur l'évolution des mitochondries que sur les différentes variations provoquées expérimentalement au cours de la cancérisation. Cette étude constitue la deuxième partie du présent travail.

D E U X I E M E P A R T I E

RECHERCHES SUR LA CATALASE

I N T R O D U C T I O N

La catalase (E.C.1.11.1.6) a été l'un des premiers enzymes dont l'activité ait été pressentie : dès 1818, THENARD découvre l'eau oxygénée et remarque que tous les tissus vivants contiennent un principe qui la décompose. La catalase est également un des premiers enzymes isolé et purifié. On a rapidement défini son rôle dans l'élimination de l'eau oxygénée toxique produite au cours des différentes étapes du métabolisme. On a aussi remarqué sa présence d'une part, en petites quantités, dans tous les tissus, de l'autre, en quantités massives dans certains tissus spécialisés. Et pourtant, cet enzyme, l'un des premiers découverts, et très étudié, est, en fait, peu connu. LEHNINGER pouvait encore affirmer récemment que "le rôle cellulaire véritable de la catalase est un mystère persistant de la biochimie" (79.

La catalase se présente sous la forme d'une grosse molécule de poids moléculaire de l'ordre de 250.000 . Le groupement prosthétique est constitué par une molécule de ferriprotoporphyrine dont les chaînes latérales d'acide propionique sont neutralisées (l'hématine). Suivant les espèces et les organes, on trouve 3 ou 4 hématines par molécule. La spécificité de l'enzyme est déterminée par la nature de la protéine liée au groupement prosthétique et par les groupements d'acides aminés assurant cette liaison. Cette spécificité distingue la réaction catalasique de la réaction peroxydasique dans laquelle l'enzyme mis en jeu (peroxydase dont le groupement prosthétique est le même) utilise l'eau oxygénée pour oxyder d'autres substrats, mais ne libère pas d'oxygène moléculaire.

La première fonction connue de la catalase est donc celle de décomposer l'eau oxygénée. La catalase est particulièrement active et son "turn-over number" est parmi les plus élevés connus. Cette réaction a d'abord été considérée comme une réaction enzymatique classique impliquant la participation du complexe intermédiaire enzyme-substrat. Mais, au cours de la réaction catalasique, il se produit une conversion lente de ce complexe (complexe I), mise en évidence par CHANCE, en un deuxième complexe qui implique une deuxième molécule d'eau oxygénée (complexe II de CHANCE) (CHANCE, 25). Or, ce complexe est catalytiquement inactif ; il en résulte une inactivation partielle de la catalase par l'eau oxygénée et une erreur possible dans la détermination de la constante de vitesse de la réaction (Kat. f.) (25). Dans notre travail, nous aurons à tenir compte de cette inactivation partielle de la catalase.

Mais si ce rôle de la catalase explique bien sa présence à faible concentration dans tous les tissus, il n'explique pas sa présence en quantités massives et non catalytiques dans certains d'entre eux et, plus particulièrement, dans le foie. Ce fait est d'autant plus digne d'intérêt que la catalase est une molécule très active.

Une deuxième fonction de la catalase, liée à la première, a été découverte par la suite (66 , 8) : l'enzyme possède, également, une activité peroxydasique très spécifique et peut, dans certaines conditions, utiliser l'eau oxygénée pour oxyder certaines petites molécules telles que le méthanol, l'acide formique et l'éthanol. Les deux activités de la catalase évoluent parallèlement et sont inhibées par les mêmes substances (8). Nous remarquerons qu'un homogénat de foie, très riche en catalase, possède également la propriété d'oxyder ces petites molécules. Ainsi, cette fonction peroxydasique de la catalase hépatique lui fait-elle jouer un rôle important dans

le métabolisme des fragments à un seul carbone, et particulièrement dans le catabolisme de l'acide formique (formé notamment au cours de la dégradation de la cellulose) (8). Mais ici encore, la richesse en catalase de certains tissus n'est pas expliquée.

Une troisième fonction de la catalase a été signalée par CHANCE dès 1956 (27) : sa participation aux oxydations phosphorylantes avec mise en jeu d'un donneur d'hydrogène non identifié. Celles-ci, selon de nombreux auteurs, sont souvent améliorées en présence de catalase (88).

Enfin, une fonction nouvelle a été découverte récemment par LEHNINGER et ses collaborateurs, fonction expliquant justement sa présence en quantités massives dans certains tissus (94). Or, c'est cette fonction, directement reliée aux mitochondries, qui nous intéresse tout spécialement.

Nous avons vu, dans les chapitres qui précèdent, que les mitochondries, sous l'influence de différents facteurs, pouvaient subir un gonflement, activement inversé par l'ATP. Or, le glutathion induit un gonflement de nature tout à fait différente. En particulier, il est irréversible et l'addition de l'ATP dans le milieu n'entraîne pas le retour des mitochondries à l'état contracté. Mais LEHNINGER et ses collaborateurs ont montré que ce gonflement était accompagné par la libération dans le milieu, d'un facteur actif, issu des mitochondries (77). Ce facteur actif restaure la contraction induite par l'ATP et il existe une proportionnalité entre la quantité de facteur introduit dans le milieu et l'amplitude de la contraction observée. Par contre, comme ce facteur actif n'influence pas la vitesse de la contraction, il ne s'agit pas d'une action enzymatique. Ce facteur a été isolé à partir des mitochondries, il a été purifié et identifié. Il se résoud en trois constituants moléculaires : les facteurs CI, CII et CIII. Le facteur CI a été

identifié avec la peroxydase du glutathion, le facteur CIII est une petite molécule encore non identifiée, enfin le facteur CII, responsable de 15 à 20 pour cent de l'activité "C" totale, a été identifié avec la catalase. En effet, la catalase pure, cristallisée, est douée de l'activité "C" : aptitude à restaurer la contraction, induite par l'ATP, de mitochondries qui ont auparavant gonflé en présence du glutathion. Les particules les plus riches en activité "C" sont aussi, d'après LEHNINGER, celles qui présentent l'aptitude la plus grande au gonflement. Ainsi, les trois constituants du facteur "C" assurent-ils le maintien des mitochondries à l'état contracté. Le facteur "C" intervient également dans le couplage de la chaîne respiratoire, couplage relié au cycle de gonflement et de contraction des mitochondries (94).

Nous voyons ainsi que cette dernière fonction de la catalase est très importante et qu'elle explique, peut-être, mieux que les autres, sa présence en quantités massives dans certains organes et tissus : elle s'avère être un très important facteur de contrôle de la membrane mitochondriale et du maintien de la structure des mitochondries.

Nous avons vu que la catalase est présente en quantités catalytiques dans la quasi-totalité des tissus. Toutefois, certaines en sont particulièrement riches : erythrocytes, rein et surtout foie (8). On a cherché à la localiser à l'intérieur de la cellule, et principalement dans la cellule hépatique. Toutefois, cette étude est rendue difficile par le fait que l'enzyme diffuse facilement à travers les membranes biologiques. Cette diffusion peut revêtir un caractère passif ou actif. Ainsi, lorsqu'on isole les différents constituants cellulaires, par centrifugation fractionnée dans le saccharose isotonique, on retrouve la catalase en proportion variable dans le liquide surnageant cytoplasmique (48). Pourtant, dans ces conditions,

les mitochondries sont métaboliquement fixées par le saccharose (81). Or, la catalase n'en diffuse pas moins dans le milieu ambiant. Cette diffusion peut être plus active : elle se produit aussi lorsque les mitochondries gonflent en présence de glutathion (94). Pour toutes ces raisons, on a d'abord recherché la catalase dans le surnageant d'un homogénat centrifugé (34).

Un progrès dans l'étude de la localisation de la catalase a été apporté par l'utilisation de la polyvinylpyrrolidone : cette grosse macromolécule assure en effet la rétention intraparticulaire de la catalase. Ainsi GREENFIELD et PRICE, en fractionnant la cellule hépatique du rat dans une solution de saccharose en présence de polyvinylpyrrolidone, ont ils pu montrer que la catalase était localisée dans les mitochondries, d'où ils ont, même, pu l'extraire (48). Or, NOVIKOFF a justement remarqué que ce milieu préservait particulièrement bien la structure de ces particules (95).

On a donc admis pendant plusieurs années que la catalase était localisée dans les mitochondries. L'enzyme, d'après ADAMS, serait même synthétisé dans les mitochondries et passerait par perméabilité dans le milieu liquide cytoplasmique ambiant, au fur et à mesure du besoin en cet enzyme (4).

Plus récemment, de DUVE et ses collaborateurs ont séparé, de la fraction mitochondriale, des particules de taille inférieure et ont alors montré que le site véritable de la synthèse de la catalase était dans l'une d'elles : les "microbodies" (18). Ces derniers seraient alors un siège important du métabolisme de l'eau oxygénée : on sait en effet qu'ils contiennent également l'urate oxydase et la d-amino acide oxydase.

Cependant, la catalase n'est pas uniquement localisée dans les microbodies. En effet, en étudiant le facteur C , LEHNINGER a montré que les mitochondries (débarrassées des particules submitochondriales) sont toujours très riches en

catalase. Il a, également, montré que le facteur C , et aussi la catalase, étaient associés à toutes les membranes actives.

Nous voudrions signaler, à ce sujet, que la localisation de la catalase a été principalement étudiée en dosant son activité, c'est-à-dire en dosant l'eau oxygénée décomposée. Or, son action sur les propriétés "mécanochimiques" de la membrane mitochondriale n'évolue peut-être pas parallèlement à son activité enzymatique.

Il est bien connu que l'activité de la catalase hépatique diminue au cours de la cancérisation (54). Cette diminution accompagne aussi bien le cancer du foie que celui d'un autre organe (55) et se produit dans le cas d'une tumeur primaire comme dans le cas d'une tumeur transplantée (51). Ce phénomène paraît spécifique de la malignité, puisqu'il n'accompagne pas les croissances non malignes (52).

Il nous faut toutefois signaler que cette baisse d'activité enzymatique accompagne aussi d'autres perturbations apportées à l'organisme : par exemple en cas de jeûne (101), de carence alimentaire (119), d'amaigrissement (90), ou d'injection de certaines hormones comme la thyroxine (56). On pourrait donc penser que cette baisse d'activité enzymatique résulte d'un effet secondaire au développement de la tumeur qui entraîne précisément des troubles de même nature. Pourtant, chaque fois que cet effet secondaire a pu être compensé, la diminution d'activité de la catalase hépatique a persisté (20). On peut donc en conclure que cette baisse d'activité enzymatique reste spécifique du développement de la tumeur.

On a imaginé différents mécanismes susceptibles d'expliquer cette diminution d'activité enzymatique : par exemple une exigence métabolique accrue du fait de la tumeur, entraînant un effet analogue à celui d'une carence alimentaire (119). On a aussi vérifié dans certains cas qu'il se produisait

une inhibition de la synthèse de la catalase, au cours de la cancérisation (foie de souris) (24) ; on a également mis en évidence l'élaboration par le tissu tumoral d'une substance toxique diffusant dans l'organisme : la "toxohormone" (25). Dans certains cas, en effet, il a été vérifié que cette toxohormone inhibait in vitro l'activité de la catalase hépatique. Mais nous voudrions signaler, à ce sujet, que les mécanismes responsables de l'inhibition de la catalase, in vitro et in vivo sont différents (10).

Parmi les hypothèses qui expliquent la diminution et même la disparition de la catalase hépatique, au cours de la cancérisation, nous nous sommes particulièrement intéressée à celle d'ADAMS (3) : le processus de cancérisation serait caractérisé, selon lui, par une perturbation de la distribution intracellulaire de la catalase hépatique. Ainsi, dès 1949, EULER et HELLER ont-ils remarqué que la catalase disparaissait du surnageant cytoplasmique, chez des animaux porteurs de tumeur (41). ADAMS a développé cette idée et a montré que la disparition de la catalase hépatique au cours de la cancérisation s'expliquait initialement par une altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale à la catalase (3). Cette rigidité accrue de la membrane entraînerait la rétention de la catalase dans les mitochondries et sa disparition du milieu cytoplasmique. Mais, par la suite, la catalase intraparticulaire disparaît également.

Pour vérifier quelques-unes de ces hypothèses, dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressée à quelques uns des problèmes posés par la catalase, et plus particulièrement à ceux qui nous paraissaient liés aux mitochondries. Nous avons étudié la distribution intracellulaire de la catalase hépatique chez un animal normal. Cette étude nous a donné quelques résultats intéressants, relatifs

à la perméabilité des mitochondries à la catalase. Ensuite, nous avons suivi l'évolution de la catalase hépatique et celle de sa distribution intracellulaire, au cours d'une cancérisation expérimentale du foie de rat induite par la diéthylnitrosamine. Cette étude nous a apporté des renseignements sur l'évolution des mitochondries au cours de la cancérisation.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I - Dosage de la Catalase

Nous avons dosé la catalase par son action sur l'eau oxygénée. Nous discuterons, à la fin de ce chapitre, de la signification à donner à ce dosage.

Dans nos premières expériences, nous avons cherché la vitesse de décomposition de l'eau oxygénée par mg de poids sec de nos extraits. Par la suite, nous avons modifié cette technique de manière à ramener les résultats (eau oxygénée décomposée) à des unités de catalase pure, cristallisée.

1 - Dosage de l'eau oxygénée

A - Dosage spectrophotométrique

Nous avons tracé le spectre d'absorption de l'eau oxygénée (à une concentration de 2×10^{-3}M) à l'aide du spectrophotomètre de Beckmann et nous avons trouvé une absorption maximum à 220 $m\mu$. Nous avons donc dosé l'eau oxygénée par son absorption à 220 $m\mu$ (19). Nous avons ensuite établi une gamme-étalon en préparant des solutions d'eau oxygénée dans l'eau distillée à des concentrations allant de 0 à 3×10^{-2}M : la variation de la densité optique en fonction de la concentration de l'eau oxygénée est linéaire.

Nous avons pu ainsi suivre la décomposition de l'eau oxygénée en fonction du temps, provoquée par des coupes de foie de rat. Nous nous sommes aperçue que de multiples interférences

se produisaient à cette longueur d'onde ; aussi avons-nous cherché une autre méthode de dosage, applicable aux milieux biologiques, souvent troubles, que nous avons étudiés.

B - Dosage titrimétrique

Nous avons ensuite dosé l'eau oxygénée par iodométrie. La réaction de dosage est la suivante :

$$H_2O_2 + 2\ I\ K \longrightarrow 2\ KOH + I_2$$

L'iode libéré est titré par l'hyposulfite :

$$2\ S_2O_3Na_2 + I_2 \longrightarrow 2\ INa + S_4O_6Na_2$$

On effectue le titrage en présence de molybdate d'ammonium et d'empois d'amidon suivant la technique traditionnelle.

Remarque : la solution d'hyposulfite est préparée dans de l'eau distillée fraîchement bouillie et débarrassée de gaz carbonique. Avant chaque dosage, l'hyposulfite est titré par une solution d'iodate de potassium, suivant la réaction :

$$I\ O_3K + 5\ IK + 6\ HCl \longrightarrow 6\ KCl + 3\ I_2 + 3\ H_2O$$

l'iode libéré est dosé par l'hyposulfite.

2 - Détermination de l'activité catalasique

1 - Activité catalasique de coupes de foie de rat

(nous décrirons plus loin la préparation des coupes mêmes)

Le test d'activité enzymatique s'effectue de la scrte : Dans un récipient cônique de 10 ml, on introduit 5 ml d'eau oxygénée à $3,2 \times 10^{-2}$M. Ensuite, on introduit une coupe de foie tout en déclenchant un chronomètre. Toutes les minutes, on prélève 1 ml du milieu réactionnel, on l'introduit dans un tube à essai contenant 0,5 ml d'acide sulfurique N. On complète le volume à 3 ml avec de l'eau distillée. On mesure la densité

optique de cette solution. On en déduit la concentration de l'eau oxygénée après 0, 1, 2, 3 et 4 minutes. Pour éviter la présence dans le milieu de protéines libérées par les coupes et susceptibles d'interférer dans le dosage de l'eau oxygénée à 220 m_μ, nous avons remplacé l'acide sulfurique par l'acide perchlorique qui précipite les protéines et nous avons centrifugé nos solutions avant de mesurer leur densité optique. La concentration de l'eau oxygénée résiduelle est alors déterminée d'après une droite obtenue à partir de solutions-étalon contenant l'acide perchlorique à la même concentration que les solutions à doser.

A la fin de chaque détermination, on place la coupe de foie dans une étuve à 108°C , pendant 48 heures, et on mesure son poids sec.

Nous avons exprimé ces premiers résultats en moles d'eau oxygénée décomposée par minute et par mg de poids sec.

2 - Deuxième méthode de détermination de l'activité catalasique

Nous avons cherché une unité d'activité enzymatique susceptible de nous servir d'étalon pour toutes nos mesures. Nous avons donc dosé l'eau oxygénée avant et après l'action de l'extrait étudié, pour une concentration donnée, un volume donné et un temps donné (1).

Dans un becher contenant 20 ml d'eau oxygénée 0,025 M dans le tampon phosphate 0,02 M pH 6,8 , on introduit 0,2 ml de la suspension à étudier. On laisse la réaction se poursuivre pendant 4 minutes sous agitation magnétique à 0°C et pH 6,8 . On l'arrête en introduisant 3 ml d'acide sulfurique à 50% et on dose l'eau oxygénée résiduelle par iodométrie comme nous l'avons précédemment indiqué. Les résultats sont exprimés en mg H_2O_2 décomposée en 4 minutes par mg de poids sec. Nous avons pu, de cette manière, comparer l'activité catalasique d'homogénats de

foie de rat différemment traités et également de coupes de foie de rat.

3 - Etalonnage de la Catalase

Nous avons ensuite cherché à exprimer nos résultats d'une manière plus quantitative : nous avons dressé des courbes d'étalonnage de la catalase. Nous avons préparé des solutions de catalase pure, cristallisée pour des concentrations variant de 0 à 250 µg/ml. Avec chaque solution, nous avons effectué le test d'activité enzymatique précédemment décrit. Nous avons ensuite tracé la courbe représentant la quantité d'eau oxygénée décomposée en fonction de la concentration de la catalase (dans des conditions très précises). Les solutions-étalons, tout comme les extraits étudiés, contenaient de l'éthanol à une concentration finale de 0,01 M pour éviter l'inactivation partielle de la catalase par formation du complexe II de Chance (25) et de l'octylphénol-polyoxyéthylène (Sinnova) à 0,1%. Nous avons dosé la catalase sur des extraits placés dans des milieux différents ; aussi avons nous tracé les courbes d'étalonnage de l'enzyme dans les mêmes milieux : tampon phosphate 0,02 M pH 6,8 et Saccharose 0,25 M contenant de la polyvinylpyrrolidone à 10%. Nous discuterons plus loin de l'intérêt et de la signification de ces différents milieux.

II - Différents traitements subis par les animaux

Nous avons utilisé, dans nos expériences, des rats Wistar, mâles, pesant entre 220 et 230 g : on sait que le temps d'induction de la tumeur est plus bref chez les mâles (100). Les animaux normaux ont été nourris avec les galettes Standard Nourri-Labo.

Dans nos premières expériences sur des rats porteurs d'hépatome, nous avons provoqué la cancérisation expérimentale du foie à l'aide d'un régime cancérigène établi par LACASSAGNE

et HURST (Fondation Curie), dont les caractéristiques principales sont : carence en protéines et en flavines, et teneur en DAB (paradiméthylaminoazobenzène) de 0,06 %.

Dans quelques expériences, nous avons déterminé l'activité catalasique de foies de rats partiellement irradiés avant la mise au régime cancérigène. L'irradiation du foie est précédée d'une anesthésie de l'animal au rectanol (Tribromoéthanol à 2,5% dans l'hydrate d'amylène dans du KCl aqueux à 1,15%). La dose, unique, est tantôt de 1500, tantôt de 3000 r. L'irradiation portait sur le lobe droit et sur une partie du lobe bifide, le reste du corps étant protégé par des lames de plomb. (Fondation Curie). L'administration du régime cancérigène ne commence qu'après le rétablissement complet de l'animal (28 jours après l'irradiation).

Nous avons également étudié l'activité catalasique de foies de rats porteurs de l'hépatome ascitique de ZAJDELA (126). Dans ce dernier cas, nous avons provoqué l'hépatome par une injection des cellules ascitiques dans la cavité péritonéale des animaux.

Nous avons, enfin, suivi l'évolution de la catalase hépatique tout au long d'une cancérisation induite par la diéthylnitrosamine : $(C_2H_5)_2$ N-NO. Le mode d'action cancérigène de ce corps est en partie connu : on a montré récemment que la diéthylnitrosamine, après activation métabolique, alkylait les acides nucléiques du foie : on y a notamment relevé la présence de 7-éthylguanine . Et cette alkylation est en relation avec la formation de l'hépatome (85).

On a également montré que ce corps est un cancérigène puissant, préférentiel du foie chez le rat, et que son action était pratiquement indépendante des individus (38). Ainsi il a été possible de provoquer une cancérisation du foie chez des cobayes qui sont habituellement résistants aux hépatocancérigènes (39).

Dans nos expériences, cette forme de cancérisation nous paraît plus intéressante que celles induites par le DAB et ses homologues : en effet, elle est provoquée uniquement par l'administration du cancérigène sans qu'il soit nécessaire d'adjoindre au traitement subi par les animaux d'autres variations expérimentales telles qu'un régime carencé en protéines et en vitamines, nécessaire pour obtenir l'induction d'un hépatome par le DAB (100). Or, ces variations sont déjà susceptibles de perturber, par elles-mêmes, l'activité catalasique du foie (101 , 119). Enfin, il est aisé de provoquer la cancérisation par la diéthylnitrosamine : contrairement au DAB, celle-ci est soluble dans l'eau à la concentration nécessaire et il suffit d'administrer régulièrement aux animaux une boisson contenant le cancérigène à la dose voulue.

Nous avons utilisé la diéthylnitrosamine synthétisée dans notre laboratoire suivant la méthode de VOGEL (117) qui consiste à distiller à sec un mélange de diéthylamine, d'acide chlorhydrique dilué et de nitrite de sodium :

$(C_2H_5)_2NH + NO_2Na + HCl = (C_2H_5)_2N\text{-}NO + HCl + H_2O$

Nous avons vérifié, au préalable, que la quantité moyenne d'eau consommée par animal et par jour était de 30 ml. Nous avons également vérifié que la présence de la diéthylnitrosamine n'influençait pas cette consommation. Sachant que la dose cancérigène est de 1,5 mg par jour (107), nous en avons déduit la concentration de la solution à administrer quotidiennement aux animaux : 50 mg/litre. La densité de la diéthylnitrosamine étant de 1,006, nous avons préparé une solution de ce corps à la concentration de 0,050 ml/litre et l'avons administrée ad libidum aux animaux expérimentés.

Nous avons suivi les résultats ainsi obtenus sur un élevage-témoin : nous avons obtenu une formation régulière d'hépatomes au bout de 140 $\pm$ 10 jours.

III - Préparation du matériel biologique

Nous avons successivement étudié l'activité catalasique présentée par des coupes de foie, par des homogénats entiers et par les différents constituants cellulaires séparés par centrifugation différentielle.

1 - Préparation des coupes

Pour cette préparation, nous avons utilisé un microtome du type Stadie-Riggs (112).

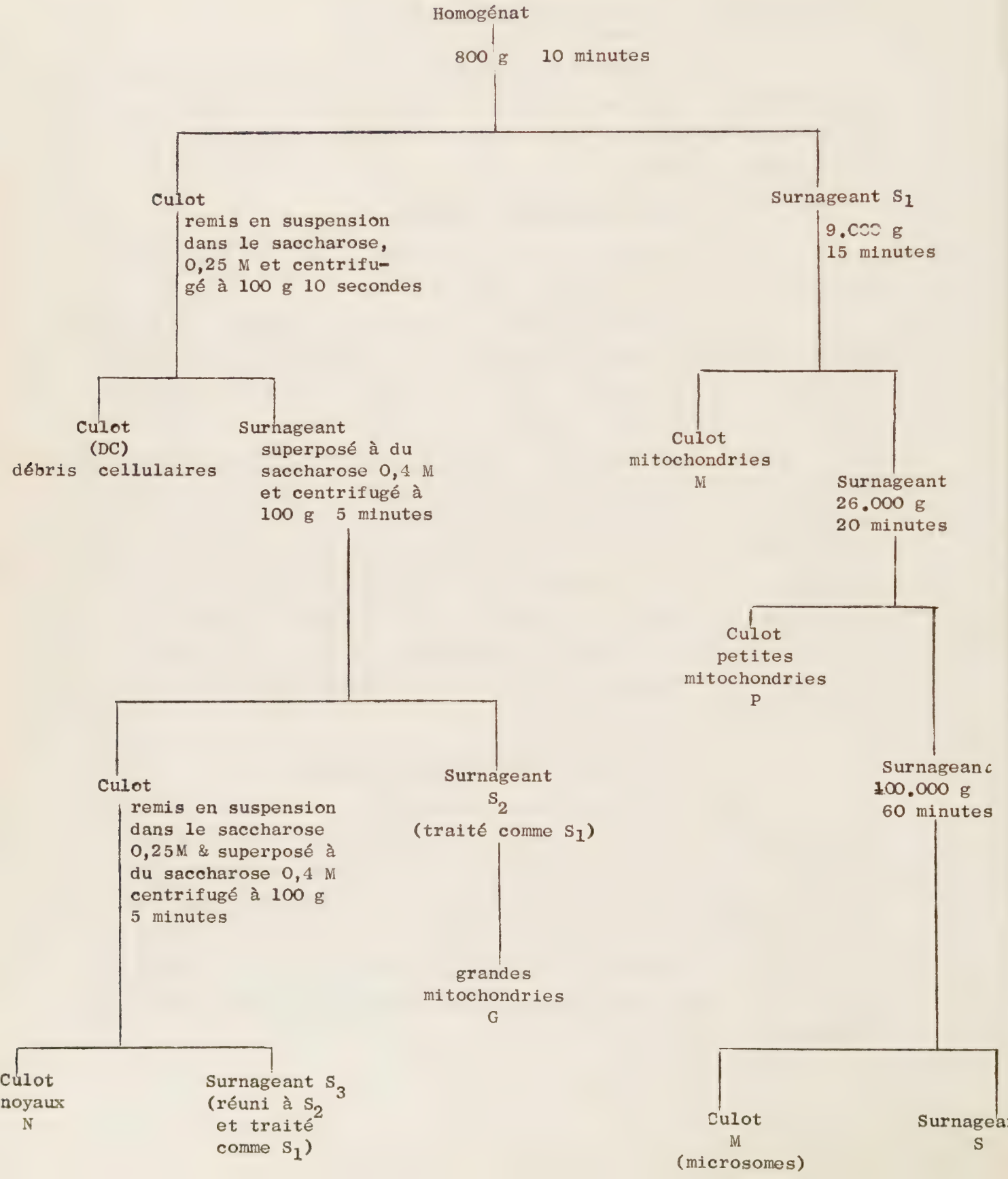
On découpe un petit fragment de l'organe, on l'intercale entre deux lames de plexiglas au préalable humidifiées avec une solution saline (KCl isotonique), on le découpe en parcelles très fines à l'aide d'une lame de rasoir qui suit de près le bord inférieur de la lame supérieure. Un dispositif mécanique règle l'intervalle compris entre les lames et assure une certaine uniformité de l'épaisseur des coupes. Nous avons à plusieurs reprises déterminé cette dernière grandeur à partir du poids frais, du volume et de la surface. Cette dernière dimension est obtenue en superposant les coupes (placées dans une boite de Pétri contenant une solution de KCl) à du papier millimétrique. Les coupes que nous avons préparées présentaient une épaisseur de 0,13 $\pm$ 0,02 mm.

2 - Préparation d'homogénats entiers

Dans nos premières expériences, nous avons recherché l'activité catalasique totale de foies de rats différemment traités. Nous avons donc effectué un broyage assez prolongé (120 secondes) du foie (au préalable perfusé) dans de l'eau distillée glacée, au moyen du broyeur Ultra-turrax. Cette homogénéisation est effectuée dans une proportion de 1 g de foie pour 10 ml d'eau. Nous avons ainsi obtenu une lyse totale des cellules.

TABLEAU I_A

CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE



3 - Séparation des différentes fractions cellulaires

Pour étudier la localisation de la catalase à l'intérieur de la cellule hépatique, nous avons séparé ses différents constituants par centrifugation différentielle, suivant la technique de SCHNEIDER et HOGEBOOM (109). Le foie a été au préalable soigneusement perfusé, ce qui est important car les globules rouges sont riches en catalase (25 , 8) et broyé comme nous l'avons déjà décrit. Le milieu de broyage, cette fois-ci, est constitué par du Saccharose 0,25 M contenant de la polyvinylpyrrolidone à 10% qui assure la rétention intraparticulaire de la catalase (48). Aussi, pour tenir compte de cette viscosité accrue du milieu, avons nous effectué les deux premiers broyages au moyen de l'Ultra-Turrax ralenti de telle sorte que l'intensité est de 0,65 Amp pour une tension de 120 volts, et le troisième sous une intensité de 0,56 Amp., comme pour la préparation des mitochondries. Nous avons vérifié au microscope à contraste de phase que l'homogénat obtenu ne contenait presque plus de cellules entières. Nous avons ensuite effectué la centrifugation différentielle en utilisant les centrifugeuses refroidies de type "International" (modèle P R II) et "Spinco". Le schéma de la centrifugation est donné sur le tableau I_A.

Nous avons ainsi séparé les fractions suivantes :

DC : débris cellulaires (cellules entières, membranes)
N : noyaux
G : "grandes" mitochondries
M : mitochondries "moyennes"
P : "petites" mitochondries
M : microsomes
S : fraction cytoplasmique soluble

Remarques :

Nous avons séparé trois fractions mitochondriales :

1) Nous avons, comme pour la préparation des mitochondries (technique I) récupéré les mitochondries "lourdes" qui ont

précipité avec les noyaux au cours de la première centrifugation, en reprenant la technique de superposition de deux solutions de densités différentes.

2) Nous avons séparé les mitochondries "M" qui sédimentent à une force de gravité de 9.000 g pendant 15 minutes.

3) Nous avons, enfin, cherché à séparer les particules qui sédimentent à 26.000 g pendant 20 minutes et qui, de ce fait, doivent être de taille intermédiaire entre celle des mitochondries et celle des microsomes.

Comme nous avons effectué un bilan de la catalase totale, nous n'avons pas cherché à purifier les différentes particules séparées : cette purification ne pouvant s'effectuer qu'avec des pertes quantitatives considérables, nous nous rappellerons que les fractions de mitochondries légères sont enrichies en lysosomes et en "microbodies".

Dans une première série d'expériences, nous avons effectué ce fractionnement dans un milieu dont le pH est 6,8 (pH optimum pour l'activité de la catalase). Dans une deuxième série, nous avons préféré effectuer le fractionnement à pH 7,4 qui est considéré comme optimum pour la préservation des mitochondries.

Préparation des différentes fractions pour le dosage de la catalase

Nous avons traité à part les surnageants S_1 , d'une part, et S_2 et S_3 de l'autre. Ces deux derniers, en effet, sont constitués par les différentes "eaux de lavage" des particules et constituent la fraction L, alors que le surnageant S_1 correspond au liquide surnageant cytoplasmique dilué au cours de l'homogénéisation du foie. Nous avons amené toutes les fractions liquides à des volumes définis avec la solution de saccharose. Nous avons lysé les fractions particulaires avec le tampon phosphate et nous avons amené ces suspensions à des volumes

définis. Toutes les suspensions ont été additionnées d'éthanol à une concentration finale de 0,01 M et d'octylphénolpolyoxyéthylène (SINNOVA) à une concentration finale de 0,1 % . Ce détergent, anionique, libère en effet toute la catalase qui peut être encore retenue dans les particules (7). Enfin, les suspensions ont été traitées à plusieurs reprises au broyeur Ultra-Turrax et diluées convenablement pour le dosage de la catalase.

Nous avons ainsi déterminé la quantité de catalase contenue dans chaque fraction et avons ramené la grandeur obtenue au foie entier. Nous avons également dosé la catalase totale contenue dans l'homogénat entier. Nous avons comparé la somme des valeurs obtenues pour chaque fraction avec la quantité de catalase totale de l'homogénat entier et nous avons comparé ces deux valeurs (Rendement).

Nous avons traité à part les fractions G, M et S de manière à déterminer, en plus, la concentration de la catalase dans l'eau mitochondriale et dans l'eau cytoplasmique. Nous n'avons pas eu la possibilité d'effectuer cette détermination sur la fraction "P" ("petites" mitochondries) par suite de la quantité insuffisante de matériel obtenu.

1 - Fractions M et G :

Nous avons effectué la dernière centrifugation dans des tubes préalablement tarés de manière à mesurer le poids frais total de ces fractions. Ensuite, nous avons prélevé un échantillon de particules de poids frais connu, nous les avons lysées dans le tampon phosphate, amené les suspensions à des volumes définis et effectué le dosage de la catalase. Sur un autre échantillon, également pesé, nous avons déterminé la teneur en eau par la méthode de dessication. Nous avons ainsi calculé, pour ces deux fractions, la concentration de la catalase en mg par g d'eau mitochondriale.

2 - Fraction S (surnageant cytoplasmique) :

Nous avons calculé la dilution de la fraction cytoplasmique soluble par la solution de saccharose au cours de l'homogénéisation du foie, en utilisant la méthode de dessication : nous avons déterminé le pourcentage d'eau du foie entier et celui de l'homogénat initial (correspondant à un poids frais connu du foie). Le facteur de dilution est alors donné par le rapport de ces deux grandeurs. Nous avons également déterminé la teneur en eau du liquide surnageant cytoplasmique, et l'avons corrigé par le facteur de dilution précédemment calculé. Nous avons donc finalement déterminé la concentration de la catalase dans l'eau du cytoplasme (en mg par g d'eau).

Dans une série d'expériences, nous avons dosé également les protéines contenues dans chaque fraction par la méthode du BIURET. Nous avons vérifié au préalable que la polyvinylpyrrolidone n'interférait pas dans ce dosage. Ce dernier est effectué par rapport à un s tandard (sérumalbumine) dans les mêmes milieux que les suspensions à doser.

Nous avons finalement, pour chaque expérience, calculé les coefficients suivants :

1) Le pourcentage de la catalase de chaque fraction par rapport à la catalase totale, cette valeur nous permettant de préciser la localisation de l'enzyme.

2) Le pourcentage des protéines de chaque fraction par rapport aux protéines totales, ce coefficient nous montrant l'importance de la fraction même.

3) Le pourcentage de la catalase par rapport aux protéines de chaque fraction, qui nous donne la concentration de l'enzyme dans la fraction.

4) Enfin, un coefficient que nous appellerons concentration relative : rapport du pourcentage de la catalase au pourcentage des protéines, nous donnant une idée du degré de purification

de la fraction obtenu par rapport à l'homogénat initial.

En portant sur un graphique, pour chaque fraction, en abscisses le coefficient 2) et en ordonnées le coefficient 4), et en mettant bout à bout les rectangles obtenus, on obtient, pour chaque expérience, un diagramme de la distribution intracellulaire de l'enzyme (DE DUVE, 35). Là où le rectangle est le plus relevé, se trouve concentré l'enzyme étudié. Nous discuterons des diagrammes que nous avons obtenus en présentant les résultats de nos expériences.

5) Enfin, nous avons calculé, pour chaque expérience, la concentration de la catalase dans l'eau des mitochondries et dans l'eau du cytoplasme (en mg par g d'eau).

6) Nous avons alors défini le coefficient de distribution de l'enzyme entre les milieux liquides intra- et extraparticulaires par le rapport des deux concentrations précédemment calculées.

T A B L E A U I

Activité catalasique

de coupes de foie de rat normal

	N° exp.	M (H_2O_2) / minute / mg p. sec. (vitesse initiale)
Animal jeune	I	$12,2 \times 10^{-4}$ $7,2 \times 10^{-4}$
	2	$5,5 \times 10^{-5}$ $5,8 \times 10^{-5}$ $6,3 \times 10^{-5}$
Animal âgé	3	$3,6 \times 10^{-3}$ $3,4 \times 10^{-3}$ $2,5 \times 10^{-3}$
	4	$2,6 \times 10^{-3}$ $3,9 \times 10^{-3}$

Les coupes sont introduites dans 5 ml d' H_2O_2 $3,2 \times 10^{-2}$ M .

Toutes les minutes, on prélève 1 ml du milieu réactionnel et on arrête la réaction avec 0,5 ml d'acide sulfurique N.

L'eau oxygénée résiduelle est dosée par son absorption à 220 mμ

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ACTIVITE CATALASIQUE D'UN FOIE DE RAT NORMAL ET SOUMIS A DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

I - Vitesse de la réaction catalasique étudiée sur des coupes de foie de rat

Nous avons étudié la vitesse de décomposition de l'eau oxygénée en présence de coupes de foie de rat, suivant la méthode déjà décrite. Nous avons d'abord recherché l'activité de coupes de foies d'animaux normaux, jeunes ou âgés. Dans ces deux cas, la variation de la concentration de l'eau oxygénée en fonction du temps a une allure hyperbolique. Nous donnons les vitesses initiales de la réaction sur le tableau I. Nous trouvons une grande variabilité des chiffres obtenus, et nous l'attribuons à l'hétérogénéité même du matériel biologique expérimenté. Toutefois, chez un animal jeune, cette vitesse initiale varie entre $5,5 \times 10^{-5}$ et $12,2 \times 10^{-4}$ môles d'eau oxygénée décomposée par minute et par mg de poids sec. Chez un animal âgé, cette même grandeur varie entre $2,5 \times 10^{-3}$ et $3,9 \times 10^{-3}$M . Nous en déduisons que les coupes d'animaux âgés manifestent d'emblée une activité enzymatique nettement plus marquée. Celle-ci peut provenir soit d'une activité enzymatique proprement dite, plus élevée, soit d'une vitesse plus grande de la diffusion de l'enzyme et du substrat à travers les membranes des cellules. Mais, dans des expériences ultérieures, qui portent sur des homogénats de foie, nous retrouverons cette différence entre des animaux jeunes et âgés.

T A B L E A U II

Comparaison entre l'activité catalasique de coupes de foies irradié et non irradié de rats cancéreux

M (H_2O_2) / min / mg p. sec

N° exp.	N° essai	Lobe non irradié	N° essai	Lobe irradié
1	1	$5,9 \times 10^{-4}$	1 2	$3,3 \times 10^{-4}$ $3,9 \times 10^{-4}$
2	1 2	$2,0 \times 10^{-4}$ $1,6 \times 10^{-4}$	1 2	$2,5 \times 10^{-4}$ $2,7 \times 10^{-4}$
3	1 2 3	$6,1 \times 10^{-4}$ $6,3 \times 10^{-4}$ $5,0 \times 10^{-4}$	1 2 3	$3,0 \times 10^{-4}$ $3,9 \times 10^{-4}$ $4,7 \times 10^{-4}$
4	1 2	$18,3 \times 10^{-4}$ $18,8 \times 10^{-4}$	1	$18,7 \times 10^{-4}$
5	1 2	$2,9 \times 10^{-4}$ $6,3 \times 10^{-4}$		
6			1 2 3	$2,9 \times 10^{-4}$ $2,9 \times 10^{-4}$ $2,9 \times 10^{-4}$

Les coupes ont été prélevées sur des lobes irradiés et non irradiés de foies de rats cancéreux. L'activité catalasique des coupes est déterminée comme il est indiqué sur le Tableau I.

T A B L E A U III

Activité catalasique de coupes de foie de rat porteur d'hépatome ascitique

N° essai	M (H_2O_2) / minute / mg p. sec
1	$2,4 \times 10^{-4}$
2	$2,5 \times 10^{-4}$
3	$2,7 \times 10^{-4}$

mêmes conditions que sur le Tableau I

Nous avons étudié de la même manière l'activité de coupes de foies de rats cancéreux, sur des lobes irradiés ou non irradiés (animaux traités au DAB). On sait que les rayons X administrés localement retardent le développement d'une tumeur (71). Nous avons cherché à vérifier si cet effet protecteur de l'irradiation avait une répercussion sur l'activité de la catalase hépatique. Dans ces expériences, la vitesse de la disparition de l'eau oxygénée est constante . Ici aussi, nous observons une grande variabilité (Tableau II). Nous remarquerons que l'activité, de coupes préparées à partir de lobes non irradiés, varie entre 1,5 et 18 X 10^{-4} M.min.mg, et celle correspondant aux lobes irradiés, entre 3 et 10 X 10^{-4}M.min/mg. Ces deux grandeurs varient donc entre les mêmes limites. Nous pouvons en conclure que l'irradiation n'a pas influencé l'activité catalasique des coupes. L'activité catalasique de coupes de foie de rat porteur de l'hépatome ascitique de ZAJDELA est du même ordre de grandeur (Tableau III).

L'étude de la vitesse de la réaction catalasique sur des coupes de foie ne donne que des résultats très relatifs. Ce fait est dû, sans doute, à l'interférence de multiples facteurs dans cette détermination : vitesse de la réaction enzymatique proprement dite, épaisseur de la coupe, vitesses de la diffusion de l'enzyme et du substrat. Nous avons ensuite défini l'activité de coupes de foie par notre deuxième technique (test portant sur 4 minutes et dosage de l'eau oxygénée par iodométrie). Nous avons alors comparé l'activité catalasique des coupes avec celle d'homogénats entiers préparés à partir du même lobe de foie et avons ainsi remarqué que celle des coupes ne correspondait qu'à une très faible partie de l'activité catalasique totale du foie.

T A B L E A U IV

Activité catalasique d'homogénats entiers de foie de rats normaux

	N° Exp.	(mg H_2O_2 décomposée / 4 minutes / mg p. sec)
Animaux âgés	1	30,7 ± 1,2
	2	27,9 ± 1,2
Moyenne		29,3 ± 2,4
Animaux jeunes	3	32,5 ± 1,2
	4	15,9 ± 0,3
	5	32 ± 1,2
Moyenne		26,8 ± 5,4

Les homogénats au 1/10e sont préparés au moyen du broyeur Ultra-Turrax dans l'eau distillée glacée. Test d'activité catalasique : on introduit 0,2 ml de la suspension dans 20 ml d'H_2O_2 0,025 M dans le tampon phosphate 0,02M pH 6,8 à 0°C. La réaction est arrêtée au bout de 4 minutes par 3 ml d'H_2SO_4 à 50 p.cent. L'eau oxygénée résiduelle est dosée par titrimétrie.

T A B L E A U V

Influence de la présence de différents agents sur l'activité catalasique d'homogénats entiers

(mg H_2O_2 / 4 minutes / mg p. sec)

N° exp.	Homogénat seul	Homogénat + éthanol 0,01 M	Homogénat + Triton X100 0,1 p. 100
1	27,9 ± 3,0	34,0 ± 1,0	35,8 ± 0,3
2	40,0 ± 1,0	45,9 ± 1,5	44,7 ± 0,1

Préparation des homogénats et test d'activité catalasique : comme sur le Tableau IV.

II - Etude de la catalase hépatique dans différentes conditions expérimentales (par iodométrie)

Nous avons, cette fois-ci, choisi un étalon commun à toutes nos déterminations : tous les résultats sont exprimés en mg d'eau oxygénée décomposée en 4 minutes par mg de poids sec. La précision de cette détermination est d'environ 3 p. cent.

1 - Activité catalasique d'homogénats de foie différemment traités

Nous avons tout d'abord étudié l'activité de foies d'animaux normaux jeunes et âgés, sur des homogénats préparés comme nous l'avons décrit. Nous exposons quelques résultats sur le Tableau IV . Ces résultats nous montrent que les valeurs moyennes sont voisines dans les deux cas : 29,3 pour un animal âgé ; 26,8 pour un animal jeune. Néanmoins, dans le deuxième cas, la variabilité est plus importante (expérience N° 4 où l'activité est faible). Nous retrouverons ces différences dans nos expériences ultérieures où les conditions quantitatives seront plus précises.

Nous avons étudié l'influence de l'éthanol et du triton X-100 sur l'activité catalasique de ces homogénats (Tableau V). Nous voyons que dans les deux cas envisagés, l'addition de l'éthanol à une concentration finale de 0,01 M entraîne une élévation d'activité de 18% dans le premier cas, et de 15% dans le deuxième cas. Il s'est donc produit une inactivation partielle de la catalase par le complexe II de Chance (25) formé entre la catalase et l'eau oxygénée produite par autooxydation de nos extraits, et cette inactivation est supprimée par l'éthanol qui décompose ce complexe. L'addition du Tribon X-100 à une concentration finale de 0,1 p. 100 est accompagnée d'une légère élévation dans le premier cas, et d'une diminution dans le

TABLEAU VI

Comparaison de l'activité catalasique d'homogénats de foies de rats porteurs d'hépatome préparés à partir de lobes irradiés et non irradiés

mg H_2O_2 décomposée / 4 minutes / mg p. sec

N° exp.	lobes non irradiés	lobes irradiés
1	33,3	40,9
2	23,7	20,1
3	13,0	12,4
4	28,4	27,5
5	14,7	17,3
6	21,0	26,3
7	24,1	21,8
8	19,9	18,0
9	26,2	28,4
Moyenne ± E. standard	22,5 ± 2,1	23,8 ± 2,8

Les homogénats sont préparés à partir de lobes irradiés et non irradiés de foie de rat cancéreux comme il est indiqué dans le Tableau IV . Le test d'activité catalasique est décrit dans le Tableau IV.

second. Mais nous attribuons ces variations à des facteurs expérimentaux : en effet, nous avons préparé ces homogénats à partir de différents morceaux du même lobe de foie ; or, la catalase ne se répartit peut-être pas de manière uniforme. Nous pensons donc que dans les conditions présentes d'homogénéisation (prolongée, dans l'eau distillée), toute la catalase est déjà libérée dans le milieu, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un tensio-actif, pour obtenir cette libération. Néanmoins, par la suite, nous avons toujours dosé la catalase dans des suspensions contenant ces deux agents aux concentrations indiquées.

Nous avons à nouveau comparé l'activité enzymatique d'homogénats entiers préparés dans ces conditions à partir de lobes de foies cancéreux irradiés ou non irradiés. Nous exposons les résultats obtenus sur le Tableau VI. Nous retrouvons à nouveau une grande variabilité. Les valeurs moyennes trouvées sont identiques dans les deux cas : 22,5 pour un tissu non irradié, 23,8 pour un tissu irradié. Les écarts observés sont également proches : les valeurs se répartissent entre 13 et 33 dans le premier cas, 12 et 40 dans le deuxième. Nous pouvons donc à nouveau conclure que le choc apporté par une irradiation locale est resté sans répercussion sur l'activité catalasique totale du tissu irradié. On sait que l'exposition aux rayons X est génératfice d'eau oxygénée (42) et que celle-ci est toxique pour la catalase. Mais cet effet n'est observé que si l'on sacrifie l'animal immédiatement après l'irradiation. Nous savons toutefois que, dans ces mêmes conditions, l'activité d'un autre enzyme : la DAB-réductase, reste plus élevée du côté irradié, dans un organe en voie de cancérisation (100). Nous n'avons pas observé cet effet protecteur d'une irradiation à dose unique sur l'activité de la catalase hépatique.

T A B L E A U VII

Activité catalasique
du foie de souris

N° exp.	mg H_2O_2 décomposée / 4 minutes / mg poids sec
1	45,7
2	41,5
3	15,4
4	28,2
Moyenne	32,7

Préparation des homogénats et test d'activité catalasique :
décrits dans le Tableau IV.

Nous avons aussi cherché, par cette méthode de dosage, s'il se présentait des différences interspécifiques de l'activité de la catalase hépatique. C'est pourquoi nous avons aussi dosé l'activité enzymatique d'homogénats de foie de souris. Nous montrons les résultats obtenus sur le tableau VII. Nous observons une variabilité que nous attribuons exclusivement à des facteurs individuels. Mais nous retrouvons une valeur moyenne du même ordre de grandeur que dans les expériences précédentes. Et ces résultats semblent signifier qu'il n'y a pas, dans le cas de la catalase hépatique, de différences interspécifiques entre le rat et la souris.

En résumé, notre technique nous a donné, dans les différents cas envisagés, les valeurs suivantes pour l'activité catalasique :

foie de	rat âgé	29,3 mg	H_2O_2	décomposée/4	minutes/mg	p.sec.
"	rat jeune	26,8	"	"	"	"
"	souris	32,7	"	"	"	"
"	rat cancéreux	23,1	"	"	"	"
"	rat irradié	23,8	"	"	"	"

En tenant compte des variations qui se présentent entre les individus, nous pouvons en conclure que la catalase reste stable dans tous ces cas. Et ces résultats, en contradiction avec ceux de certains auteurs, seront retrouvés dans des expériences ultérieures (8).

2 - <u>Comparaison entre l'activité catalasique de coupes et d'homogénats entiers préparés à partir des mêmes foies</u>

Nous avons, dans ces expériences, exprimé l'activité catalasique des coupes par la même unité-étalon (dans ce cas, on introduit dans le milieu expérimental une coupe de foie et non 0,2 ml de l'extrait à étudier).

TABLEAU VIII

Comparaison entre l'activité catalasique de coupes et d'homogénats préparés à partir du même lobe de foie
(mg H_2O_2 décomposée / 4 minutes / mg poids sec)

N° exp.	Animal expérimenté	Activité des coupes	Moyenne	Activité de l'homogénat	Rapport activité de l'homogénat / activité de la coupe
1	rat normal	1,20 1,93 1,25 1,56	1,48	15,9	10,7
2	rat normal	1,06 2,00 1,40 1,45 1,95	1,57	30,7	19,5
3	souris	0,33 0,42 0,63 0,33	0,43	32,6	76
4	souris	0,55 0,57 0,36	0,49	24,2	49

La préparation des homogénats et le test d'activité catalasique sont décrits dans le Tableau IV.
activité catalasique des coupes : on introduit une coupe dans le même milieu réactionnel.

TABLEAU IX

Influence de l'incubation sur l'activité des coupes
(mg H_2O_2 décomposée/4 minutes/mg p.sec)

N° Exp.		Coupes fraîches	Coupes incubées	Milieu d'incubation
I	a)	1,36	1,12	15,7
	b) après 24 heures au froid	0,74	3,19	8,4
2	a)	1,57	1,03	12,0
	b) après 24 heures au froid	1,06	2,07	6,3

La détermination de l'activité catalasique des coupes est décrite dans le Tableau VIII.
La détermination de l'activité catalasique du milieu d'incubation est effectuée comme celle des homogènats, décrite dans le Tableau IV et exprimée en mg H_2O_2 décomposée / 4 minutes / ml du milieu d'incubation : NaCl 0,12 M, KCl 0,06 M , $MgSO_4$ 0,0012 M , glucose 0,01 M , citrate de Na 0,01 M

Nous avons, par cette méthode, obtenu, dans le cas d'animaux normaux, des résultats plus reproductibles et les différences trouvées seraient donc attribuables uniquement à l'hétérogénéité même du matériel biologique expérimenté. Nous avons calculé la moyenne des résultats obtenus à partir de quatre ou cinq coupes et nous les avons comparées avec les résultats obtenus à partir d'homogénats entiers (Tableau VIII). Nous voyons ainsi que les coupes ne manifestent que 1/10° à 1/70° de l'activité totale.

3 - Diffusion de la catalase

On sait qu'une incubation de coupes dans un milieu approprié entraîne une élévation de 70% de l'activité totale d'un homogénat préparé à partir de celles-ci (5). Nous avons donc cherché à vérifier si les coupes mêmes, après une incubation analogue, présentaient une activité plus élevée.

Le milieu d'incubation est le suivant :

NaCl	0,12 M
KCl	0,06 M
Mg SO_4	0,0012 M
Glucose	0,01 M
Citrate de Na	0,01 M

Les coupes sont incubées dans le rapport de 1,5 ml du milieu pour 20 mg de coupes (poids frais). L'incubation dure quatre heures à 37°C, sous agitation. Nous avons fait successivement cette expérience à partir d'un foie frais et d'un morceau du même foie conservé 24 heures au réfrigérateur. Nous présentons dans le Tableau IX le résultat de deux expériences successives (où chaque valeur correspond à la moyenne de quatre ou cinq déterminations). Ces expériences nous conduisent aux conclusions suivantes :

Dans les deux cas, les coupes incubées sont moins actives que les coupes fraîches ; toutefois, nous remarquons, de façon inattendue, que pour un foie qui est conservé 24 heures au réfrigérateur, les coupes fraîches sont moins actives, mais leur incubation entraîne une élévation d'activité, celle-ci étant plus forte que dans le premier cas envisagé. En même temps, le milieu d'incubation présente une activité considérable : 12 à 15 unités par ml. La catalase a donc diffusé dans le milieu pendant l'incubation.

Nous avons remarqué, en même temps, que des homogénats entiers préparés dans un tampon phosphate (0,02 M), en absence d'éthanol présentaient une activité nettement plus élevée après une conservation de 24 heures à 0° C : cette élévation peut atteindre jusqu'à 24 p. cent de la valeur initiale.

III - Etude de la distribution intracellulaire de la Catalase d'un foie de rat normal

Nous avons fractionné la cellule hépatique en ses différents constituants en suivant la méthode déjà décrite. Nous avons dosé la catalase contenue dans chacune de ces fractions et nous avons exprimé les résultats obtenus en mg de catalase pure cristallisée.

1 - Teneur du foie en catalase

Nous avons d'abord recherché la teneur du foie entier en catalase : les résultats sont alors exprimés en mg de catalase par g de poids frais (Tableau X). Dans une première série d'expériences (expériences N° 1 à 6), le pH du milieu de fractionnement est égal à 6,8 , cette valeur correspondant au pH optimum pour l'activité de la catalase ; nous avons assuré cette valeur du pH en ajoutant quelques gouttes de soude normale

TABLEAU X

Teneur en catalase d'un foie de Rat normal

N° exp.	poids du rat g	poids du foie g	mg catalase/ g p. frais	saison	âge des animaux
1	280	9,7	29,7	printemps	vieux
2	245	11,9	25,3	"	"
3	290	10,6	(16,7)	"	"
4	305	10,4	28,3	"	"
5	315	11,7	22,9	"	"
6	355	10	24,0	automne	"
7		9,0	23,9	"	"
8	263	9,9	22,2	"	"
9	200	10,5	18,5	"	"
10	292 260	14,5	(14,3)	"	jeunes
11	260 275	10,5 11,5	(15,2)	"	jeunes
12	310 325	11,9 12,3	23,4	hiver	vieux
13	300 315	14,1 11,2	21,7	"	"

Moyenne ± E.Standard 24,2 ± 1,0

Les foies sont homogénéisés dans le Saccharose 0,25 M pH 6,8 en présence de polyvinylpyrrolidone à 10 p. cent.
La catalase contenue dans les homogénats a été dosée d'après une courbe étalon (voir le Texte)

dans la solution de saccharose. Dans une deuxième expérience, le pH est 7,4 , pH optimum pour la préservation des mitochondries. Nous l'avons assuré en ajoutant le tampon(TRIS 0,2M-HCl) dans le milieu de fractionnement (expériences n° 7 à 13).

Nous remarquons que, dans tous les cas, le foie est très riche en catalase. Nous trouvons une valeur moyenne de 24,2 mg par g. de foie frais. Cette richesse en enzyme a déjà été signalée (8) : la catalase est présente en quantités non catalytiques et en excès considérable par rapport à la quantité également catalytique d'eau oxygénée qui se forme au cours du métabolisme.

Le facteur saisonnier ne paraît pas avoir une influence importante sur la teneur du foie en catalase : nous avons comparé les résultats obtenus au cours d'expériences effectuées à des saisons différentes, et avons trouvé les résultats suivants :

expériences de printemps	: 26,5 mg	catalase/g	p.frais
expériences d'automne	: 23,3	"	"
expériences d'hiver	: 22,6	"	"

Toutefois, l'âge des animaux paraît influencer davantage la catalase hépatique. Sur un même lot de rats, nous avons dosé la catalase à cinq mois d'intervalle. Nous avons alors obtenu, pour la teneur du foie en catalase, les valeurs suivantes: (en mg par g de poids frais).

4 animaux de moins de deux mois	:	14,7
4 animaux de plus de sept mois	:	22,6

Il semble donc que la teneur du foie en catalase s'élève avec l'âge des animaux.

2 - <u>Distribution de la catalase entre les différentes fractions cellulaires</u>

Nous groupons les résultats que nous avons obtenus sur le Tableau XI.

TABLEAU XI

Teneur en catalase des différentes fractions cellulaires exprimée en pourcentage par rapport à la catalase totale

N° Exp.	Débris cellulaires	Noyaux	Mitochondries			Totales	Microsomes	Surnageant cytoplasmique	eaux de lavage	Rendement en %
			moyennes	grandes	petites					
pH 6,8										
1	30	1,0	40,7 (non séparées)		6,8	47,5	6,1	11,5	3,7	71,4
2	47,8	6,2	31,6 (non séparées)		2,5	34,1	0,7	6,8	4,2	96,3
3	6,4	6,6	69,6	7,8	0.	77,4	3,7	5,1	0,9	103
4	7,9	-	40	12,5	19,7	72,2	18	10,6	3,1	81,2
5	8,7	10,5	45,5	6,6	14,0	66,1	5	8,1	1,3	107
6	3,8	2,0	19,4	6,2	42,1	67,7	8,2	17,8	1,0	115
moyenne									2,4	
pH 7,4										
7	1,3	1,6	26,2	6,8	20,1	53,1	29,0	10,0	4,5	91,3
8	2,9	3,4	31,6	22,1	13,4	67,1	6,7	12,0	6,7	84,8
9	12	12	40,9	18,3	1,6	60,8	4,5	13,0	7,5	-
10	0,3	5,8	18,9	17,3	17,5	53,7	20,9	12,1	7,0	87,5
11	0,6	4,0	39,1	13,0	15,5	67,6	20,9	8,0	5,5	94,1
12	0,6	2,0	23,4	22,5	21,5	67,4	7,4	7,4	15,0	77,4
13	0,9	3,9	26,6	27,9	13,0	67,5	6,2	6,7	12,7	86,1
14	0,30	1,5	40,3	8,1	25	73,4	10,0	5,5	7,8	78
Moyenne			43,8 ± 4,6 moyenne pour les chiffres soulignés			66,2		9,6	8,3	

Les différentes fractions cellulaires ont été séparées par centrifugation différentielle (voir Tableau IA). Les fractions particulaires ont été lysées dans le tampon phosphate 0,02 M pH 6,8. Les fractions liquides ont été diluées dans le saccharose 0,25 M. La catalase contenue dans chaque fraction a été évaluée d'après une courbe étalon, en présence d'éthanol 0,01 M et d'octyl phénolpolyoxyéthylène à 0,1 p.cent (voir le texte)

Si l'on considère l'ensemble des trois fractions mitochondriales, on constate qu'elles contiennent 70 % de la catalase totale. Dans la moitié des expériences, l'enzyme se concentre dans la fraction "M" (mitochondries moyennes, sédimentant à 9000 g pendant 15 min. (nous avons souligné les chiffres correspondants). Dans ce cas, nous observons une concentration moyenne de la catalase dans cette fraction de 44 p. cent par rapport à la catalase totale. Par contre sa distribution entre les fractions "G" ("grandes" mitochondries) et "P" ("petites" mitochondries) présente une grande variabilité. Si la catalase est localisée principalement dans les "microbodies" comme l'a montré récemment DE DUVE (18), les résultats que nous avons obtenus signifieraient que ces dernières particules accompagnent de façon variable les trois fractions mitochondriales que nous avons séparées. Néanmoins, plusieurs auteurs affirment encore que la catalase se concentre dans les mitochondries (59 , 88) et que cette concentration est en relation avec un rôle direct de l'enzyme dans le métabolisme de ces dernières (88).

Catalase cytoplasmique : Nous voyons que 9 % de la catalase totale est présente dans la fraction cytoplasmique soluble. Comme nous avons pris soin de séparer cette dernière dès la première centrifugation de l'homogénat entier, et de ne jamais la mélanger avec les "eaux de lavage" des particules, cette fraction nous paraît particulièrement préservée. Elle contient toute la catalase libérée dans le milieu après un broyage des cellules suffisamment doux pour préserver la structure de ses éléments figurés. Nous voudrions signaler que de nombreux auteurs ont trouvé une teneur du cytoplasme en catalase beaucoup plus importante : 30 % suivant ADAMS (6), et même 45 % suivant HIGASHI et PETERS (59). Il semble que toute modification technique au cours du fractionnement a une répercussion immédiate sur la distribution intracellulaire de la catalase. Ainsi,

TABLEAU XII

Teneur en eau des mitochondries
exprimée en pourcentage par rapport au poids frais

N° exp.	Fraction M	Fraction G
1	69,6	(non séparées)
2	65,1	(non séparées)
3	73,5	69,9
4	74,3	70,3
5	73,2	65,9
6	69,1	65,6
7	73,3	73,9
9	75,1	75,0
10	75,5	72,8
11	77,3	76,2
12	75,6	73,5
13	73,5	73,1
Moyenne ± E.Standard	74,0 ± 1,0	71,6 ± 1,3

La teneur en eau de chaque échantillon de mitochondries est déterminée par dessication.

TABLEAU XIII

Concentration de la catalase dans les mitochondries
et dans le cytoplasme (en mg par g d'eau)

N° exp.	Mitochondries M	Mitochondries G	Cytoplasme	Rapport catalase mitochondriale / catalase cytoplasmique M	Rapport catalase mitochondriale / catalase cytoplasmique G	Rapport des concentrations de la catalase dans les mitochondries M & G
1	45,9 (non séparées)		4,0	11,4		
2	36,2 (non séparées)		2,5	14,7		
3	33,1	14,1	1,5	22	9,3	2,3
4	64,8	24,5	4,5	14,3	5,4	2,6
5	131,0	19,8	3,5	37,6	5,7	6,6
6	61,6	17,5	7,6	8,1	2,3	3,5
7	40,1	6,9	4,0	10,0	1,7	5,8
9	13,1	13,0	4,1	3,1	3,1	1,0
10	23,9	5,8	3,0	8,0	1,9	4,1
11	22,2	7,8	1,4	15,7	5,5	2,8
12	29,2	18,2	4,7	8,3	3,9	2,1
13	22,4	17,3	3,8	5,9	4,5	1,3
Moyenne ± E. Standard			3,7 ± 1,5			3,21

Concentration de la catalase dans les fractions M et G : on prélève un échantillon de poids frais donné de particules. On le lyse dans le tampon phosphate, on dose la catalase contenue dans cette suspension comme il est indiqué sur le Tableau X. La teneur en eau correspondante est déterminée par dessication sur un autre échantillon de poids frais connu.

Concentration de la catalase dans le cytoplasme : on dose la catalase sur un aliquot du surnageant cytoplasmique soluble. La teneur en eau correspondante est déterminée par dessication ; on effectue une correction pour la dilution du cytoplasme par la solution de saccharose au cours de l'homogénéisation initiale du foie (voir le texte).

suivant DE DUVE, la manière dont est effectuée chaque décantation qui suit une centrifugation a la même importance que les forces de gravité choisies pour séparer les différents éléments figurés du cytoplasme (36).

Enfin, nous remarquerons que, dans notre deuxième série expérimentale, nous trouvons une proportion plus grande de catalase dans les eaux de lavage des particules. Or, la seule différence avec les expériences de la série précédente réside dans un pH un peu plus alcalin, pH assuré par le tampon TRIS. Nous nous demandons donc si le TRIS n'a pas une influence sur la libération de la catalase hors des particules qui la contiennent. Enfin, dans quatre expériences, nous trouvons une proportion importante de catalase dans la fraction microsomiale. Nous nous demandons donc également si, au cours d'une imperceptible modification de manipulation, nous n'aurions pas assuré le passage des "microbodies" dans cette fraction.

3 - Concentration de la catalase dans les mitochondries et dans le cytoplasme

Nous avons déterminé, par la méthode de dessication, la teneur en eau des fractions M et G et celle du cytoplasme et nous avons calculé la concentration de la catalase dans l'eau de ces trois fractions. (Nous n'avons pas eu la possibilité de faire la même étude sur la fraction P par suite de l'insuffisance de la quantité de particules obtenue). Nous donnons les résultats obtenus sur les Tableaux XII et XIII.

Nous observons à nouveau qu'il se produit d'importantes variations individuelles. La catalase est toutefois toujours plus concentrée dans l'eau de la fraction M, à l'exception de l'expérience N° 9 où cette concentration est identique pour les deux catégories de particules. Pourtant, dans cette même expérience, l'accumulation de la catalase dans la fraction M

avec plus de précision, en étudiant la teneur en eau de ces mitochondries placées dans une solution de Ringer contenant de l'ADP, et dans une solution de Saccharose isotonique. Nous pensons que nous avons provoqué cet état plus contracté en assurant la rétention de la catalase à l'intérieur des particules par l'introduction de la polyvinylpyrrolidone dans le milieu de fractionnement. Par contre, lorsque les mitochondries sont préparées et lavées dans le saccharose seul, elles perdent une partie de leur catalase qui diffuse dans le milieu extérieur. Peut-être est-ce alors pour cette raison que nous trouvons les mitochondries G dans un état de gonflement plus prononcé.

IV - Epuisement de la catalase des mitochondries

Sachant que la catalase diffuse hors des particules qui la contiennent lorsque ces dernières sont placées dans une solution de saccharose, nous avons cherché à vérifier s'il écait possible de débarrasser entièrement les mitochondries de leur catalase interne en les soumettant à des lavages répétés.

Dans ce but, nous avons préparé les mitochondries suivant la technique I, dans une solution de Saccharose isotonique ne contenant pas de polyvinylpyrrolidone, afin d'assurer au maximum la diffusion de la catalase. Nous n'avons pas cherché à séparer les particules lourdes des particules légères. Nous avons ensuite soumis les mitochondries à des mises en suspension suivies de centrifugations à la même force de gravité que celle nécessaire à leur préparation (9000 g pendant 15 minutes). Nous avons répété cette opération six fois. A chaque étape de ce lavage, nous avons, d'une part, dosé la catalase contenue dans les fractions particulaires et liquides successivement obtenues et, d'autre part, déterminé la teneur en eau de ces fractions par dessication. Ensuite, nous avons évalué la

TABLEAU XIV

Epuisement de la catalase des mitochondries à la suite de lavages répétés (animal normal)

Nombre de lavages	concentration de la catalase dans l'eau mitochondriale mg/g eau	précision	concentration de la catalase dans l'eau de lavage mg/g eau	précision	distribution de la catalase entre les milieux liquides intérieurs & extérrs	précision
3	20,6	1%	0,060	5%	343	± 21
4	14,8	1,5%	0,187	10%	79	± 2
5	11,9	1,5%	0,006	30%	1988	± 600
6	16,8	2%	0,008	25%	2100	± 500

Les mitochondries ont été préparées suivant la technique I sans séparation des particules lourdes et légères. Ensuite les culots ont été soumis à des mises en suspension suivies de centrifugations à 9.000 g 15 minutes. Aux étapes 3, 4, 5, 6 de ces lavages nous avons d'une part dosé la catalase contenue dans les mitochondries et dans les eaux de lavage correspondantes, comme il est indiqué dans le Tableau XIII ; d'autre part, déterminé la teneur en eau de ces fractions par dessication.

TABLEAU XV

Epuisement de la catalase des mitochondries à la suite de lavages répétés (animal en voie de cancérisation)

Nombre de lavages	concentration de la catalase dans l'eau mitochondriale mg/g eau (I)	précision	concentration de la catalase dans l'eau de lavage mg/g eau (2)	distribution de la catalase entre les milieux liquides intérieurs & extérrs (1) : (2)
1	2,4	60%	0,8	3,0 ± 1,8
2	0,6	100%	0,04	15,0 ±15
3	1,3	50%	0,10	13,0 ± 6
4	1,3	30%	0,02	65
5	1,3	30%	0	
6	1,5	50%	0	

Les concentrations de la catalase dans l'eau intramitochondriale et dans l'eau de lavage de chaque culot sont déterminées comme il est indiqué sur le Tableau XIV.

concentration de la catalase dans l'eau mitochondriale et l'eau de lavage correspondante. Nous avons déterminé le coefficient de distribution de la catalase entre les milieux liquides intra- et extraparticulaires par le rapport de ces deux concentrations. Nous avons suivi de la sorte la diffusion de la catalase hors des particules au cours de ce lavage.

Nous avons effectué d'une part cette expérience sur des mitochondries d'un foie de rat normal , et d'autre part sur celles d'un animal en voie de cancérisation (six mois de régime au DAB). Nous avons groupé les résultats obtenus sur les tableaux XIV et XV.

Les résultats présentés dans le tableau XIV nous montrent que, chez un animal normal, les mitochondries préparées et lavées à trois reprises dans une solution de saccharose retiennent toujours une quantité importante de catalase : 20 mg par g d'eau mitochondriale, cette valeur s'abaisse ensuite à 17 au sixième lavage. En même temps, la diffusion de l'enzyme paraît s'arrêter. La solution de lavage ne contient plus que 6 à 8 µg par g. d'eau et le coefficient de distribution atteint une valeur de l'ordre de 2.000 . Nous pensons donc que si l'on épuise les mitochondries de leur catalase interne, on arrive à un seuil de concentration interne de l'enzyme, seuil au-delà duquel la catalase n'est plus libérée par les particules.

Nous avons ensuite cherché à suivre de la même manière la diffusion de la catalase contenue dans les mitochondries d'un animal en voie de cancérisation (Tableau XV). Nous avons, cette fois-ci, à chaque étape du lavage, laissé la catalase diffuser dans le milieu extérieur pendant dix minutes, à la température ambiante. Les résultats que nous avons trouvés nous montrent que, dès le premier lavage, la catalase est peu concentrée dans les mitochondries : 2,4 mg par g d'eau mitochondriale. Nous pouvons en conclure, soit que l'enzyme a diffusé dans le milieu au cours du fractionnement, soit que les mitochondries contenaient

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

DU DEUXIEME CHAPITRE

Au cours d'expériences préliminaires où nous avions étudié l'activité catalasique d'extraits d'un foie de rat soumis à différentes variations expérimentales, nous avons établi les faits suivants :

Nous avons remarqué une stabilité notable de la catalase totale contenue dans le foie d'animaux jeunes, âgés, porteurs d'hépatomes ou irradiés. Nous pensons toutefois pouvoir affirmer que l'activité de l'enzyme est plus élevée chez des animaux âgés. Chez des animaux jeunes, la variabilité est plus marquée.

La conservation au froid de ces différents extraits est accompagnée d'une élévation de leur activité enzymatique. Nous ne nous expliquons pas encore la cause de cette influence du froid. Nous avons aussi remarqué qu'il se produisait une diffusion de la catalase dans le milieu lorsqu'on incube des coupes de foie dans un milieu salin.

Par la suite, nous avons mis au point une méthode de dosage quantitatif de l'enzyme ; nous avons pu alors préciser les faits suivants :

Nous avons trouvé une richesse du foie en catalase excédant de loin les quantités nécessaires à son action proprement catalytique et ainsi se trouve posé, une fois de plus, le problème du rôle cellulaire véritable de la catalase, rôle justifiant sa présence, dans le foie principalement, dans des proportions aussi importantes. Le facteur saisonnier paraît avoir peu d'influence sur la teneur du foie en catalase ; par contre, nous avons à nouveau observé son élévation avec l'âge

CHAPITRE III

EVOLUTION DE LA CATALASE AU COURS DE LA CANCERISATION INDUITE PAR LA DIETHYLNITROSAMINE

I - Evolution des foies et des rats au cours de la cancérisation

Nous avons commencé par suivre un élevage témoin. Nous avons traité un lot de rats à la diéthylnitrosamine, comme nous l'avons indiqué, et nous avons obtenu une formation régulière d'hépatomes au bout de 140 ± 10 jours, pour une dose moyenne de 1,5 mg de cancérigène, par animal et par jour. Le développement de cette cancérisation a été vérifié par l'examen de coupes histologiques préparées à partir des foies des animaux (Fondation Curie).

Nous avons ensuite suivi un lot de rats pendant 145 jours au cours desquels nous leur avons constamment administré le cancérigène tout en les maintenant dans des conditions de nutrition normales. Nous avons sacrifié deux animaux par expérience, nous avons prélevé les foies et les avons homogénéisés ensemble. Sur 151 animaux traités, cinq sont morts prématurément, mais, à l'autopsie, on pouvait constater que le foie était toujours cancérisé. Nous avons observé deux cas de cancer du poumon et un cas de cancer généralisé avec également un cancer du coeur, fait fort rare. Nous avons pu ainsi confirmer que la diéthylnitrosamine était un cancérigène particulièrement puissant, efficace et préférentiel du foie, chez le rat. Nous avons remarqué, au bout de 82 jours d'administration de la boisson cancérigène, l'apparition de nécroses du nez et de la queue.

Nous n'avons pas décelé d'autres anomalies au cours de cette introduction de l'hépatome.

Dans chaque expérience, nous avons pesé les animaux et les foies prélevés après leur perfusion. Nous avons déterminé le rapport du poids du foie à celui de l'animal : la variation de ce rapport est considérée comme un symptôme de la cancérisation du foie, dans le cas de l'induction de l'hépatome par le DAB (30). La valeur trouvée reste constante (fig. 1) et se maintient autour d'une moyenne de 4,5 p. cent , c'est-à-dire la même que celle observée chez les animaux normaux que nous avons étudiés dans la première partie de notre travail. Une anomalie se manifeste une fois, le soixante-quinzième jour : ce rapport a alors la valeur de 7 p. cent , mais aucune autre variation brutale n'est décelée à ce stade. Ce rapport est très élevé le 145ème jour de la cancérisation (6,7 et 15,7) mais nous nous trouvons alors en présence d'une tumeur formée et d'un foie très hypertrophié. Nous avons également déterminé la teneur en eau du foie, sur un échantillon de l'organe traité à part, en utilisant la méthode de dessication ; nous l'avons exprimé par le pourcentage de l'eau par rapport au poids frais, et avons trouvé une certaine variabilité des résultats. Dans presque tous les cas, les deux foies étudiés nous donnaient la même valeur, celle-ci oscille entre 75 et 79 p. cent (fig. 2). Mais le trente-troisième jour d'administration du cancérigène est marqué par une élévation significative de cette teneur en eau : respectivement de 81 & 85 p. cent. Or, cette variation s'observe parallèlement à de multiples anomalies au même stade que nous décrirons. Comme nous avons, dans chaque expérience, dosé les protéines contenues dans toutes les fractions et dans l'homogénat entier, nous avons également évalué la teneur en protéines du foie par leur pourcentage par rapport au poids frais (fig. 3). Nous avons trouvé une valeur stable, se maintenant autour d'une moyenne de 18 p. cent, même dans un tissu tumoral.

Nous avons ainsi constaté que cette cancérisation du foie était caractérisée par une stabilité de certaines de ses propriétés : dimension du foie, teneur en eau, teneur en protéines. Nous avons donc utilisé ces données comme bases pour suivre l'évolution de la catalase hépatique.

Nous avons déjà vu que la dimension moyenne du foie (exprimée par le rapport de son poids au poids de l'animal) ne variait pas, à l'exception du cas d'un organe nettement tumoral. L'aspect macroscopique du foie reste normal jusqu'au quarantième jour de la cancérisation. A partir de ce moment, il apparaît une granulation répartie de manière uniforme sur tous les lobes , ce qui est un indice de l'état précancéreux. Le 82ème jour, cette granulation s'est accentuée, mais est restée assez uniformément répartie, aussi avons-nous pu effectuer le fractionnement de la cellule hépatique à partir d'organes entiers, à l'exception de la dernière expérience où la tumeur était formée et où nous avons fractionné séparément le tissu nettement tumoral et le tissu adjacent à la tumeur. Par la suite,nous avons remarqué la formation de vésicules (110ème jour) et de kystes (131ème jour). Néanmoins, le réseau circulatoire n'a pas été affecté ; de ce fait, nous avons pu perfuser l'organe tout au long de la cancérisation, ce qui n'est pas possible pendant celle, induite par le DAB. Il est important, dans nos expériences, de nous débarrasser des érythrocytes. En effet, ceux-ci sont riches en catalase (25 , 8) et, de plus, on a vérifié que leur teneur en catalase n'est pas perturbée parallèlement à celle du foie (4). Cette perfusion est devenue difficile dans les dernières expériences par suite d'un ramollissement et d'une plus grande fragilité dé l'organe.

Dans toutes nos expériences, nous avons examiné l'homogénat initial en contraste de phase. Les premières semaines, ce dernier avait un aspect normal et présentait les éléments figurés du cytoplasme bien séparés. Nous avons toutefois remarqué, le

33ème jour, que les mitochondries étaient agglomérées, alors que les noyaux restaient libres dans le milieu d'homogénéisation. Cet homogénat, nous le verrons, a , de plus, sédimenté de façon anormale. A partir du quarante-septième jour, nous avons observé le développement d'un polymorphisme des noyaux, indiquant un taux important de mitoses. Nous pouvons donc admettre que, dès ce stade, la cancérisation est déclenchée. Nous avons en même temps remarqué que l'homogénat devenait visqueux et que, pour un même procédé de broyage, la proportion de cellules entières avait augmenté et variait d'une expérience à l'autre. Le 61ème jour, les mitochondries étaient à nouveau agglomérées dans l'homogénat entier et, en même temps, le polymorphisme des noyaux devenait plus important.

II - Evolution des différentes fractions

Nous avons suivi rigoureusement le même schéma de fractionnement tout au long de la cancérisation. Mais celui-ci est devenu progressivement plus difficile par suite du ramollissement du foie et de la viscosité accrue du milieu. La fraction G, en particulier, sera de plus en plus contaminée par des cellules entières et des noyaux.

Le 33ème jour, il s'est produit une véritable anomalie au cours des premières étapes de fractionnement. La première centrifugation (de 800 g pendant 10 minutes) est suivie d'une sédimentation en masse de toutes les particules. Nous avons néanmoins poursuivi le fractionnement à la manière habituelle. Mais, en plus, sur une partie aliquote de l'homogénat entier, nous avons repris cette première centrifugation et nous avons remis le culot obtenu en suspension dans la solution de saccharose. Cette fois-ci, en contraste de phase, nous n'avons plus observé cette agglomération des mitochondries et nous avons pu, à partir de cette suspension, séparer les fractions M et G à la

manière habituelle. La viscosité observée dans l'homogénat provenait donc soit du liquide surnageant cytoplasmique, soit des microsomes ; or ces derniers sont précisément le site d'action de la diéthylnitrosamine (91). Nous avons, par la suite, retrouvé cette viscosité de l'homogénat plus ou moins prononcée suivant les dates des expériences. Ces faits peuvent expliquer que, tout en suivant le même schéma de centrifugation, nous avons trouvé que les fractions séparées avaient une importance très variable d'une expérience à l'autre. Nous avons exprimé cette importance par le pourcentage des protéines de la fraction envisagée par rapport aux protéines totales.

Ainsi, la fraction S (fig. 7), surnageant cytoplasmique, a une valeur moyenne de ce rapport de 7 p. cent, mais aux 12ème et 40ème jours de cancérisation, ces valeurs passent par un maximum de 14 p. cent.

De même, l'importance moyenne de la fraction M est de 8 p. cent (fig. 12) mais les 19ème et 33ème jours, elle présente les valeurs extrêmes de 21 à 1,9 p. cent.

La fraction G (fig. 18) a une importance très variable, mais grande dans tous les cas ; elle est maxima aux 33ème et 95ème jours de la cancérisation : cette fraction contient alors 45 p. cent des protéines totales.

La fraction P (fig. 26) a aussi une importance moyenne de 7 p. cent de ce même rapport, mais le 19ème et le 27ème jours montrent un maximum de 15 p. cent , les 33ème et 40ème jours un minimum de 3 et 2 p. cent ; au-delà de cette date, son importance reste constante.

La fraction m (fig. 30) semble diminuer d'importance au cours de la cancérisation, et varie de 27 p. cent le 27ème jour à une valeur de 7 p. cent le 33ème et les derniers jours.

Nous donnons en même temps les diagrammes de la distribution intracellulaire de la catalase suivant DE DUVE (35) appliqués aux différents stades de la cancérisation, et trois

diagrammes de la distribution de l'enzyme chez des animaux normaux (fig. 35 - 58).

Ces diagrammes nous montrent que la catalase se répartit irrégulièrement entre les différentes fractions cellulaires au cours de la cancérisation. Cette variabilité est expliquée si l'on tient compte de toutes les modifications progressivement subies par les différentes particules (modification de composition, de formes, de dimension et de nombre) et également de leur tendance à s'agglomérer, comme de la viscosité modifiée du milieu. Si nous nous rappelons que la forme et la hauteur des rectangles figuratifs sont caractéristiques de l'accumulation de la catalase et leur largeur, caractéristique de l'importance des fractions, nous concluons que ces fractions sont imparfaitement séparées dans un foie en voie de cancérisation. Dans notre dernière expérience, où nous nous sommes trouvée en présence d'une tumeur très rapidement formée, nous avons tracé, à titre indicatif, les diagrammes correspondant au tissu proprement tumoral et à celui adjacent aux tumeurs. Nous remarquons que, dans les deux cas, l'enzyme est présent dans toutes les fractions mais se concentre davantage dans les fractions M et P du tissu tumoral (fig. 57 & 58).

Nous pouvons donc conclure à une séparation assez arbitraire des différents constituants cellulaires. C'est pourquoi, avant d'étudier la localisation et l'évolution d'un enzyme dans une fraction donnée, il nous paraît nécessaire de mettre au point une technique de séparation et de purification de la fraction même. De plus, cette technique doit subir certaines modifications à chaque étape de la cancérisation.

III - Evolution de la catalase hépatique

Les restrictions que nous avons énumérées dans le paragraphe précédent ne concernent pas les résultats suivants :

1 - Catalase totale

Nous avons évalué la teneur du foie en catalase en déterminant, à chaque stade de la cancérisation, le pourcentage de la catalase totale par rapport au poids frais de l'organe (fig. 4). Les valeurs obtenues oscillent autour d'une moyenne de 15 p. cent . Cette valeur diminue à partir du 131ème jour au moment de la formation de la tumeur (12 p. cent). Mais la catalase reste aussi présente dans un tissu tumoral (8 p. cent par rapport au poids frais de l'organe).

Nous avons également évalué le pourcentage de la catalase par rapport aux protéines du foie entier (fig. 5) : les nombres obtenus oscillent autour d'une valeur moyenne de 8 p. cent, sans présenter de variations significatives. Toutefois, une diminution se manifeste également le 131ème jour (6 p. cent).

Ainsi, il est intéressant de constater que, dans cette forme de cancérisation, la diminution de la teneur du foie en catalase se manifeste les tous derniers jours du développement de la tumeur. Néanmoins, l'enzyme ne disparaît pas dans la tumeur formée.

2 - Catalase cytoplasmique

Nous trouvons que 8 p. cent de la catalase totale est présente dans le cytoplasme (fig. 6). Cette valeur est voisine de celle que nous avions précédemment trouvée chez des animaux normaux (9 p. cent). Elle s'abaisse jusqu'à 4 p. cent en fin de cancérisation(à partir du 117ème jour), c'est-à-dire bien après l'apparition des indices macroscopiques et microscopiques du processus. La concentration de la catalase dans les

protéines (exprimée en pourcentage) oscille autour de la valeur moyenne de 8 p. cent et s'abaisse à partir du 124ème jour (fig.8)

Nous remarquerons que, le 33ème jour, la catalase cytoplasmique a une importance exceptionnelle : 15,5 p. cent de la catalase totale (fig. 6). Cependant, le pourcentage en protéines de la fraction garde sa valeur habituelle. Nous en concluons que cette importance en catalase n'est pas due à la contamination du cytoplasme par les éléments provenant des autres fractions.

Nous retrouvons cet enrichissement en catalase sur la courbe représentant la concentration relative (fig. 9). En même temps, la concentration de la catalase dans l'eau du cytoplasme reste remarquablement stable (fig. 10) et garde une valeur moyenne de 3 mg par g d'eau (nous avions trouvé une valeur de 3,7 p. cent chez des animaux normaux). Or, nous avons remarqué que, à cette même date, les deux foies entiers avaient une teneur en eau anormalement élevée. Ainsi, ces deux variations simultanées, enrichissement en eau et en catalase, ont pour effet de maintenir constante la concentration de la catalase dans l'eau cytoplasmique. Nous discuterons, à la fin de ce travail, de la signification à donner à ces résultats.

3 - Catalase des autres fractions

En tenant compte des restrictions mentionnées dans le paragraphe II, nous présentons les résultats que nous avons obtenus à partir des différentes fractions particulaires. Ces résultats peuvent être considérés comme les éléments d'un travail d'approche pour étudier l'évolution de la catalase dans ces fractions au cours de l'induction d'un hépatome.

a - Catalase de la fraction M

Le pourcentage de la catalase de cette fraction par rapport à la catalase totale (fig. 11) oscille autour d'une valeur moyenne de 20 p. cent , tout en présentant une certaine

variabilité. Mais nous avons vu que cette fraction même a une importance variable d'une expérience à l'autre. Le pourcentage de la catalase par rapport aux protéines (fig. 13) s'abaisse au départ et passe de 25 à 6 le 27ème jour, puis revient à une valeur moyenne de 16. La concentration de la catalase dans l'eau des particules se maintient autour d'une valeur moyenne de 20 mg par g. d'eau mitochondriale (fig. 15). Cette valeur reste inchangée au 33ème jour (nous l'avons déterminée sur des particules traitées à part). Nous remarquerons également que la teneur en eau des mitochondries (fig. 23) ne varie pas et garde la valeur moyenne de 74 p. cent , comme chez les animaux normaux. Nous remarquons toutefois deux pics de la courbe représentant la concentration de la catalase (fig. 15) : celle-ci s'accumule nettement dans l'eau des particules les 54ème et 61ème jours. En même temps, nous n'apercevons pas de modifications au niveau du cytoplasme. Le coefficient de distribution de la catalase entre les milieux liquides intérieur et extérieur oscille autour d'une valeur moyenne de 10 et s'élève à 20 et 17 aux mêmes dates (fig. 16).

b - Catalase de la fraction G

Nous avons vu que cette fraction était très importante et plus ou moins contaminée suivant les dates par des noyaux et des cellules entières. Cette contamination paraît s'accentuer au cours de la cancérisation et il s'en suit une importance croissante en même temps de la catalase et des protéines de cette fraction (fig. 17 & 18). Le pourcentage de la catalase par rapport aux protéines présente une valeur moyenne de 8 p. cent (fig. 19) que nous avons déjà trouvée pour un homogénat entier. Nous en concluons que la purification de cette fraction n'est pas satisfaisante. La concentration de la catalase dans l'eau des particules (fig. 21) oscille autour d'une valeur moyenne de 15 mg par g. d'eau et le coefficient de distribution

de l'enzyme entre les milieux liquides intérieur et extérieur, autour d'une valeur moyenne de 5 . La teneur en eau des particules de la fraction (fig. 24) garde une valeur moyenne de 71 p. cent.

c - Catalase de la fraction P (petites mitochondries)

Le pourcentage de la catalase de cette fraction par rapport à la catalase totale (fig. 25) oscille autour d'une valeur moyenne de 15 p. cent . Cette valeur s'élève au moment de la formation de la tumeur. Le pourcentage de la catalase par rapport aux protéines oscille autour d'une valeur moyenne de 15 et s'abaisse au 124ème jour (fig. 27). La valeur trouvée pour la concentration relative oscille entre 1 et 2 , c'est-à-dire entre les valeurs trouvées chez les animaux témoins (fig.28).

d - Catalase des microsomes

Nous avons trouvé une proportion importante de catalase dans cette fraction qui contient 20 p. cent de la catalase totale jusqu'au 47ème jour de cancérisation (fig. 29). Ce chiffre s'abaisse progressivement à 4 p. cent. Nous avons vu que l'importance de la fraction évoluait de manière analogue. La courbe représentant le pourcentage de la catalase par rapport aux protéines (fig. 31) marque initialement une élévation le 12ème jour puis se stabilise autour d'une valeur moyenne de 6.

Nous voudrions signaler également que les quantités de protéines et de catalase trouvées dans les eaux de lavage des particules augmentent au cours de la cancérisation. Nous expliquons ce fait par une fragilité accrue des particules au cours du processus : celles-ci libèrent plus facilement leurs différents constituants dans le milieu ambiant.

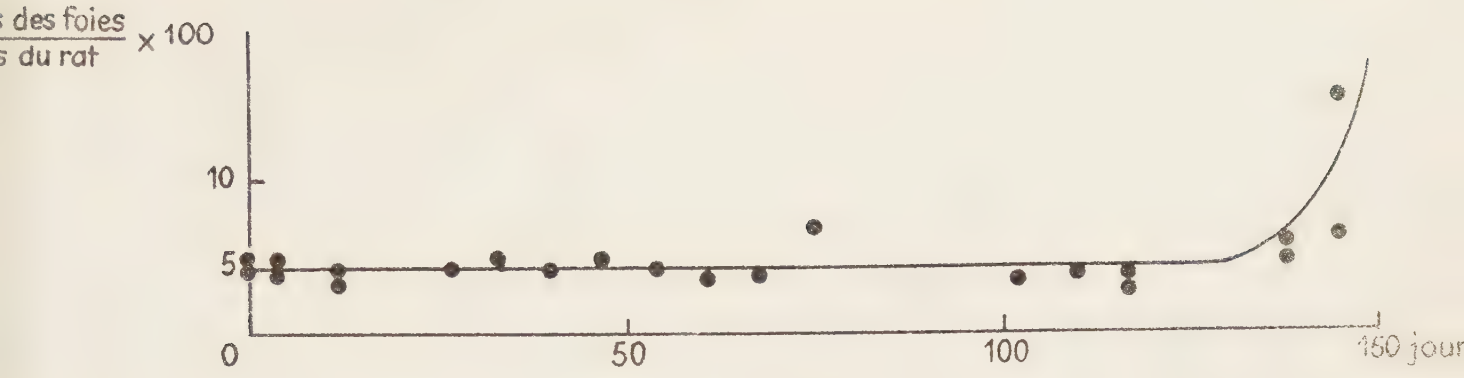


fig. 1

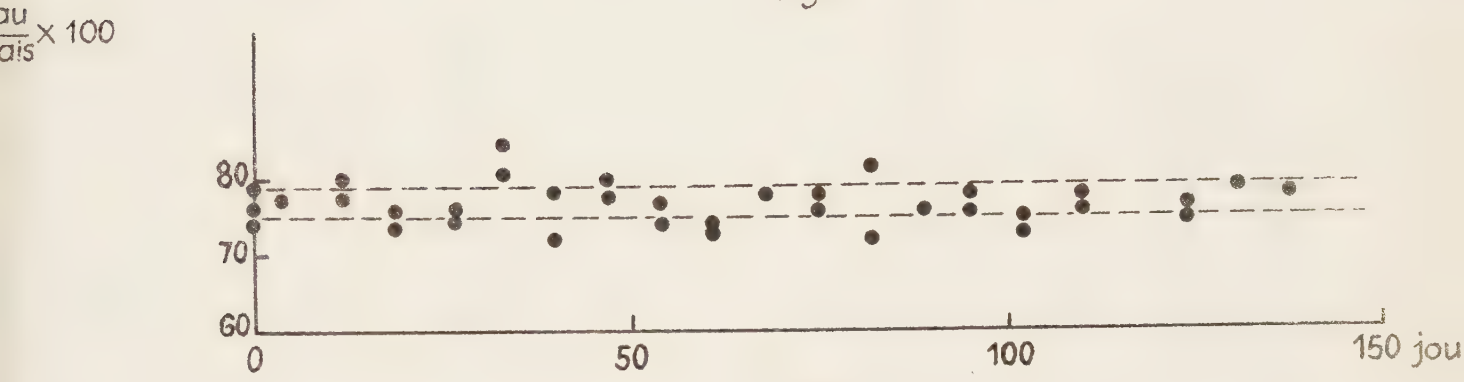


fig. 2

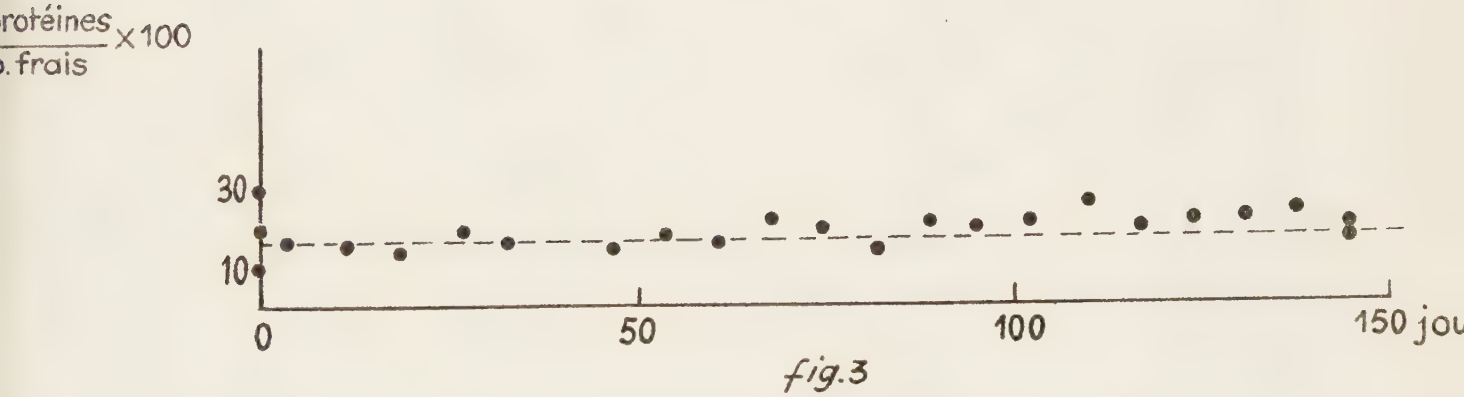


fig. 3

I Evolution des foies

fig.1) Rapport du poids du foie au poids de l'animal exprimé en pourcentage. Les animaux ont été pesés avant leur mise à jeun; les Foies ont été pesés après leur perfusion.

fig.2) Teneur en eau du foie : déterminée sur un échantillon par la méthode de dessication et exprimée par le pourcentage par rapport au poids frais.

fig.3) Teneur en protéines de foie : exprimée en pourcentage par rapport au poids frais. Les protéines totales ont été dosées sur l'homogénat entier par la méthode du Biuret.

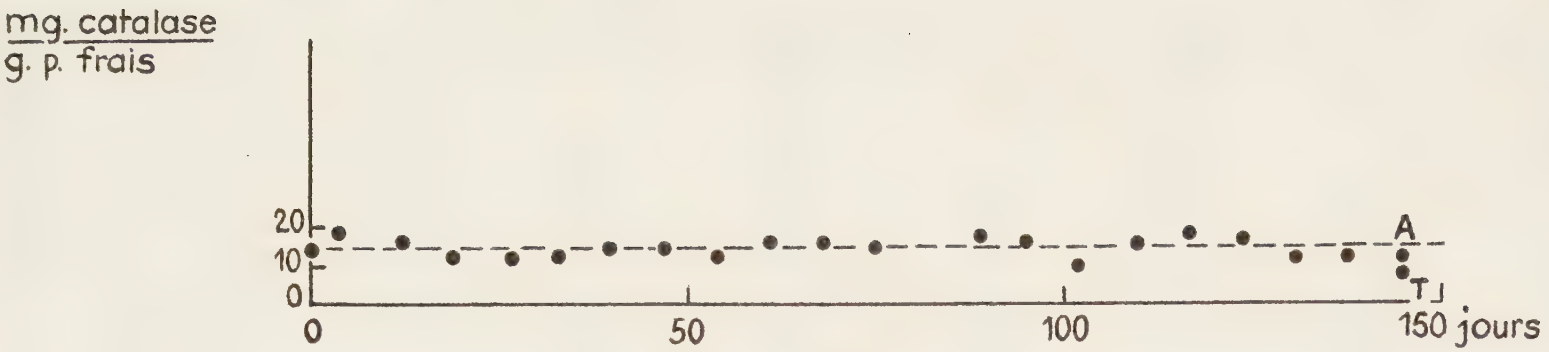


fig. 4

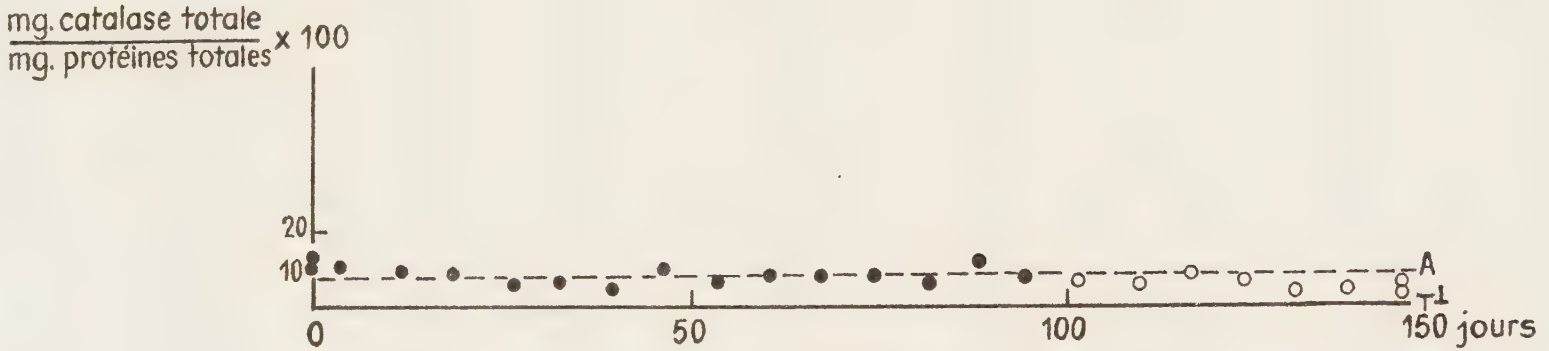


fig. 5

II Catalase totale

fig.4) Pourcentage de la catalase totale par rapport au poids frais. La catalase a été dosée sur un aliquot de l'homogénat entier.

fig.5) Pourcentage de la catalase par rapport aux protéines : la catalase totale et les protéines totales ont été dosées sur un aliquot de l'homogénat entier.

g. catalase S / g. catalase totale x 100

fig.6) Pourcentage de la catalase cytoplasmique par rapport à la catalase totale.

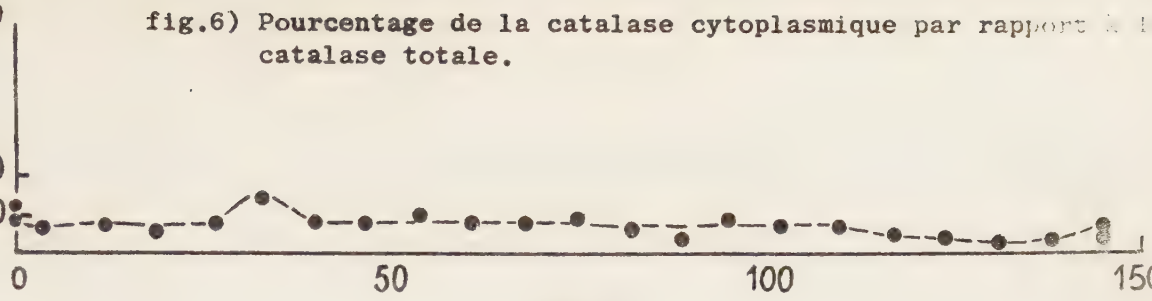


fig. 6

g. protéines S / g. protéines totales x 100

fig.7) Pourcentage des protéines de la fraction par rapport aux protéines totales.

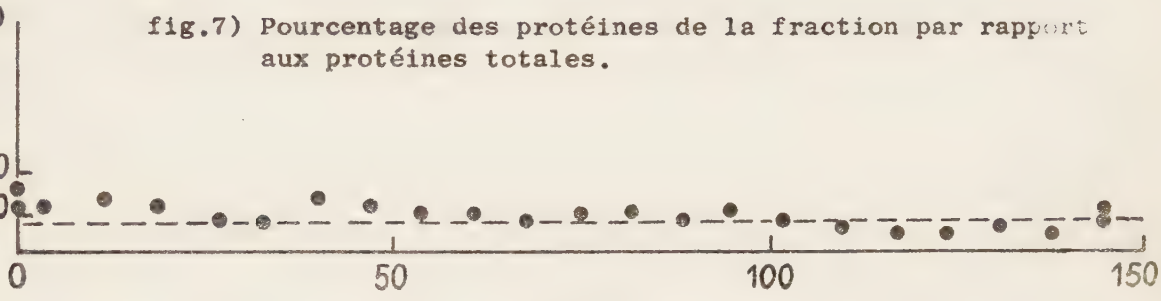


fig. 7

g. catalase S / g. protéines S x 100

fig.8) Pourcentage de la catalase par rapport aux protéines.

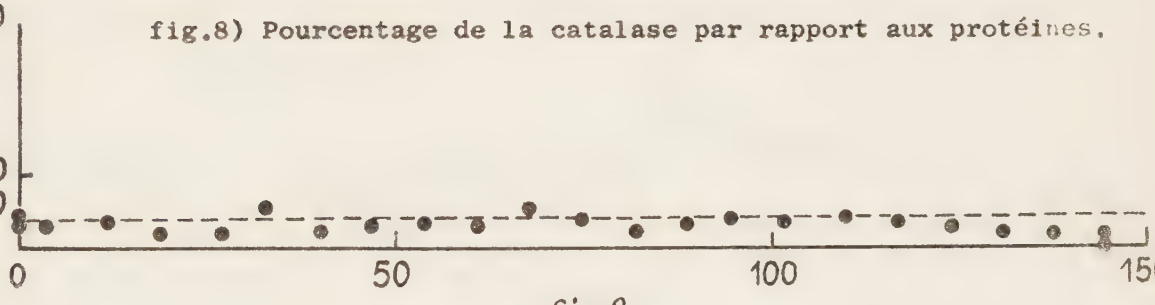


fig. 8

urcentage catalase S / urcentage protéines S

fig. 9) Concentration relative : rapport du pourcentage de la catalase au pourcentage des protéines.

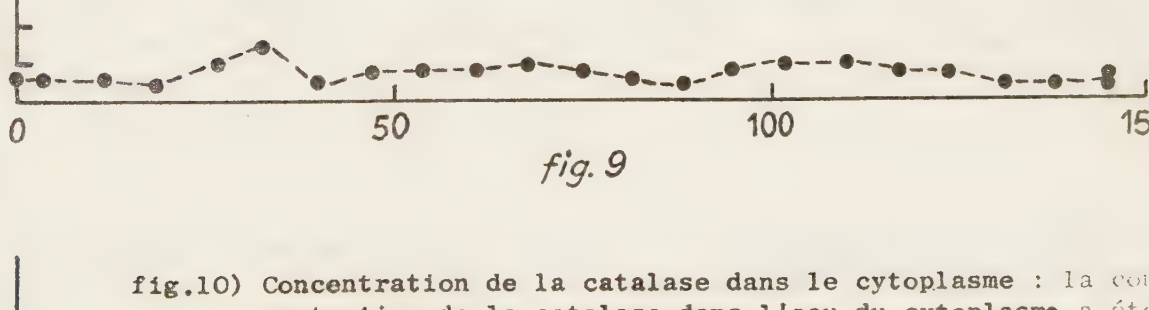


fig. 9

g. catalase / g. eau

fig.10) Concentration de la catalase dans le cytoplasme : la concentration de la catalase dans l'eau du cytoplasme a été évaluée comme il est indiqué sur le Tableau XIII.

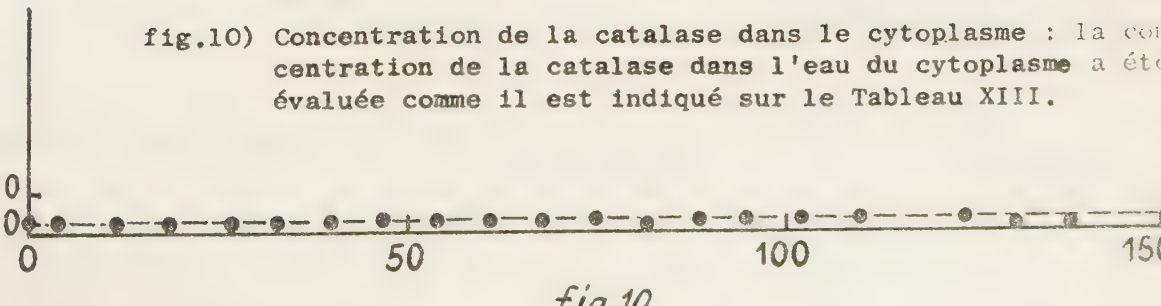


fig. 10

III Catalase cytoplasmique (S)

fig.11) Pourcentage de la catalase de la fraction par rapport à la catalase totale.

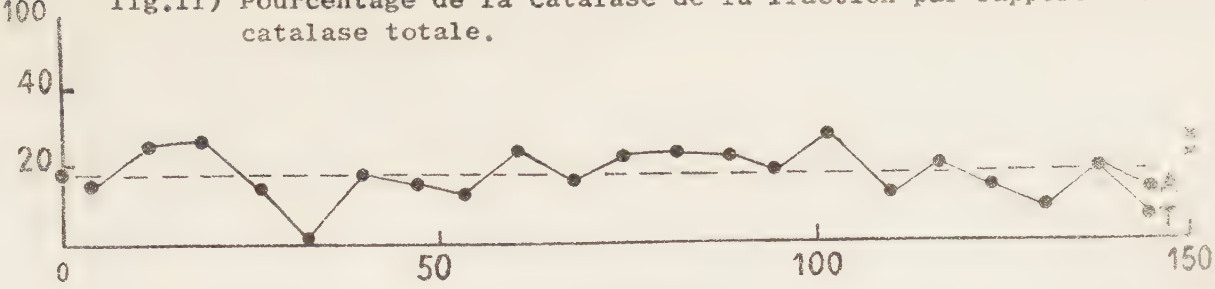


fig.11

fig.12) Pourcentage des protéines de la fraction par rapport aux protéines totales.

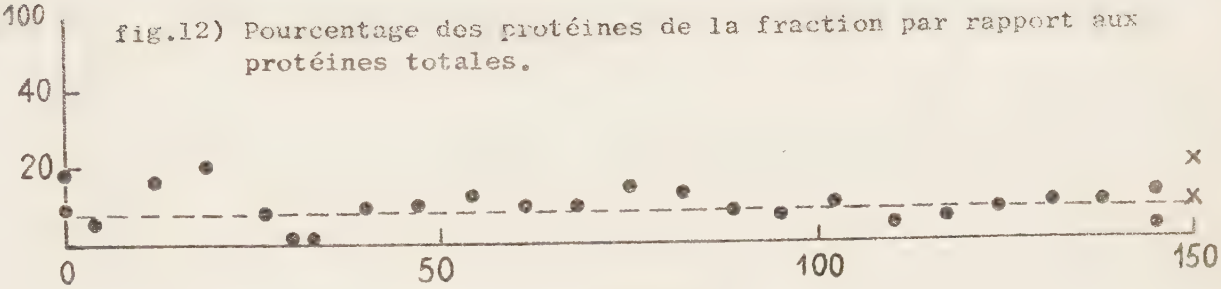


fig.12

fig.13) Pourcentage de la catalase par rapport aux protéines de la fraction.

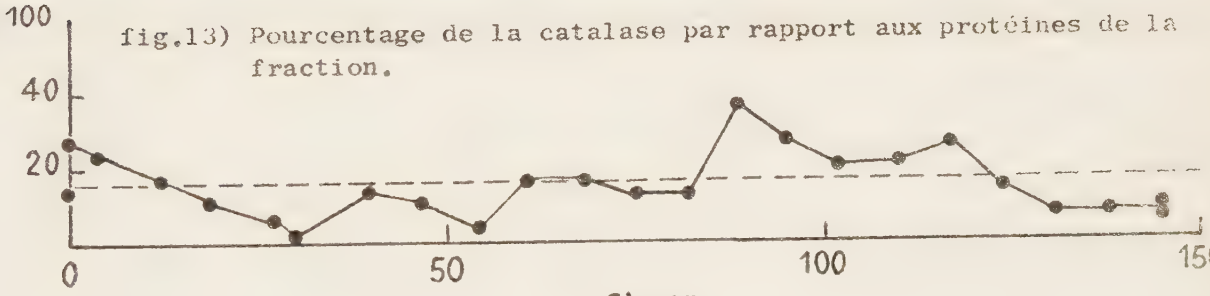


fig.13

fig.14) Concentration relative (voir fig. 9).

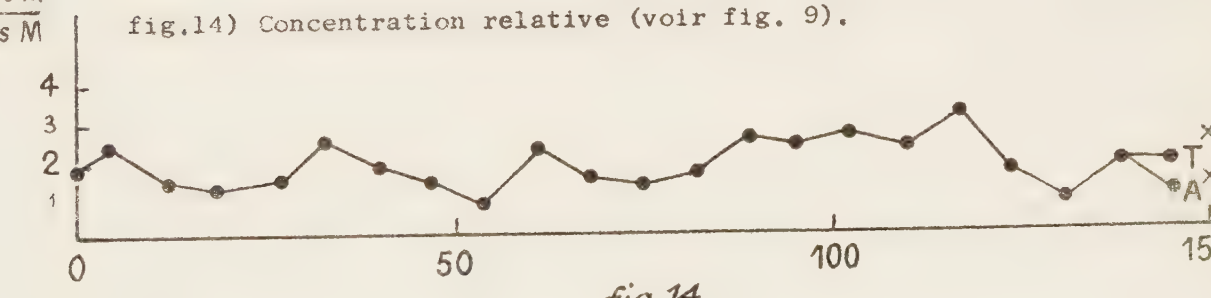


fig.14

fig.15) Concentration de la catalase dans l'eau intramitochondriale : conditions expérimentales décrites dans le tableau XIII.

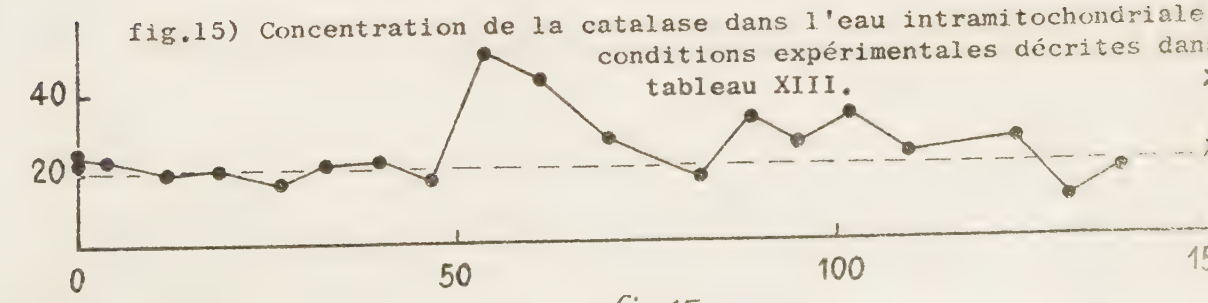


fig.15

IV Catalase de la fraction M

oncentration M / oncentration S

fig.16) Coefficient de distribution de la catalase entre les milieux liquides intra et extra particulaires pour la fraction M.

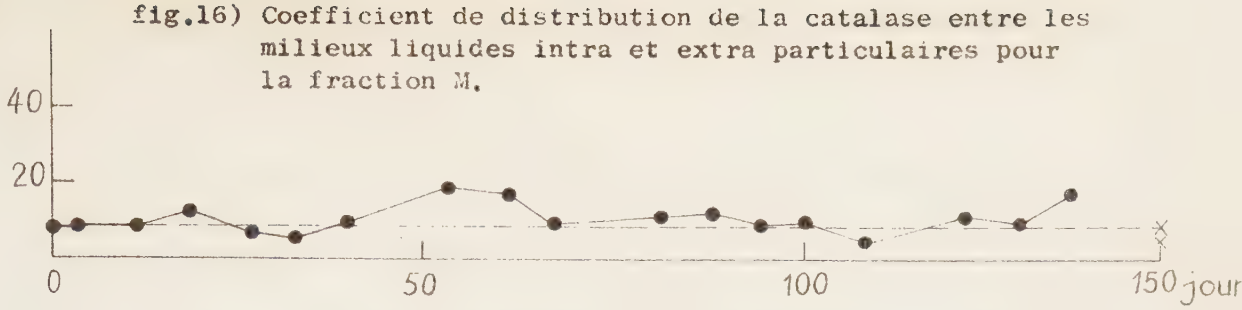


fig 16

V Catalase de la fraction M

mg. catalase G / mg. catalase totale x100

fig.17) Pourcentage de la catalase de la fraction par rapport à la catalase totale.

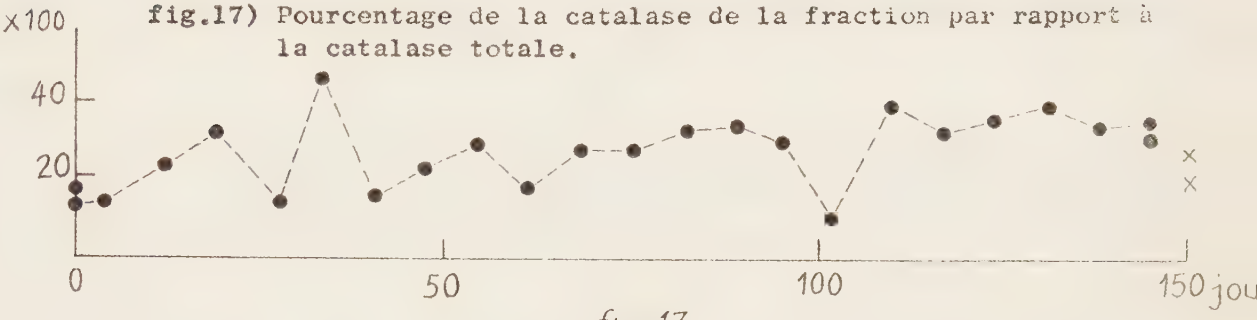


fig 17

mg. protéines G / mg. protéines totales x100

fig.18) Pourcentage des protéines de la fraction par rapport aux protéines totales.

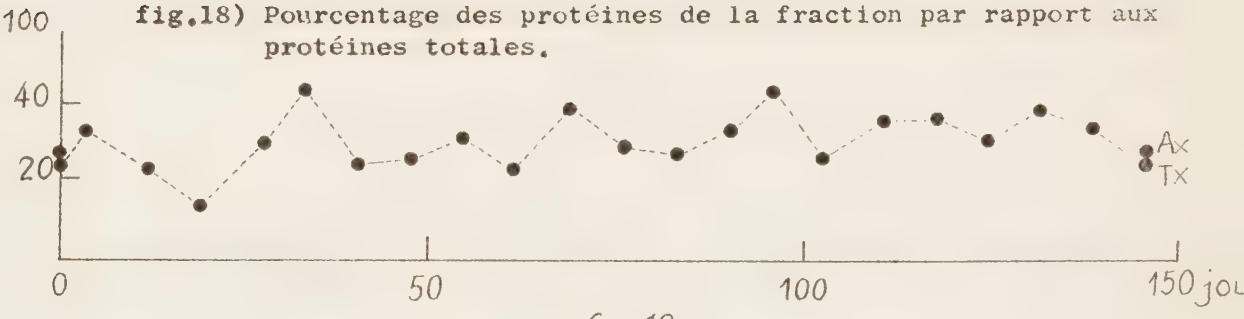


fig 18

ng catalase / ng. protéines x 100

fig.19) Pourcentage de la catalase par rapport aux protéines de la fraction.

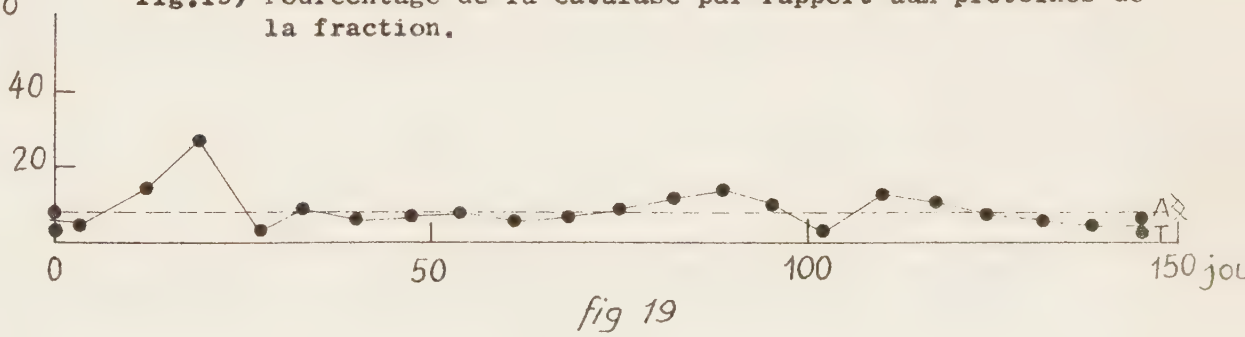


fig 19

ourcentage catalase G / ourcentage protéines G

fig.20) Concentration relative (voir fig.9)

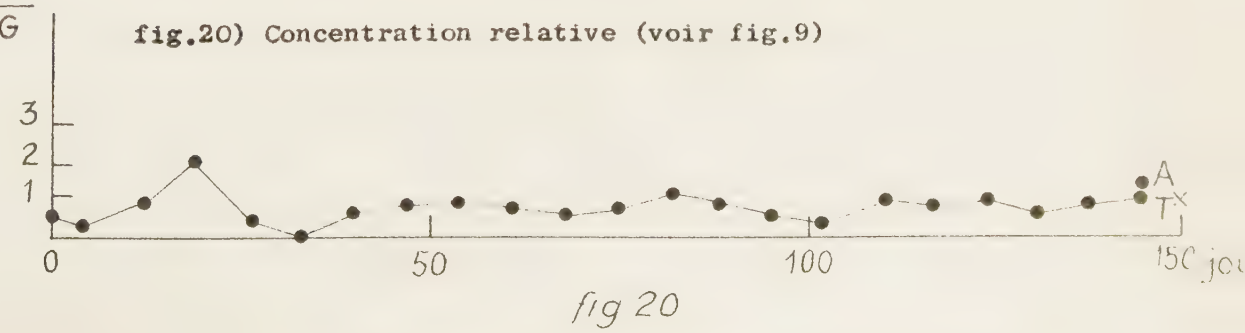


fig 20

VI Catalase de la fraction G

ng. catalase / g. eau

fig.21) Concentration de la catalase dans l'eau intramitochondriale

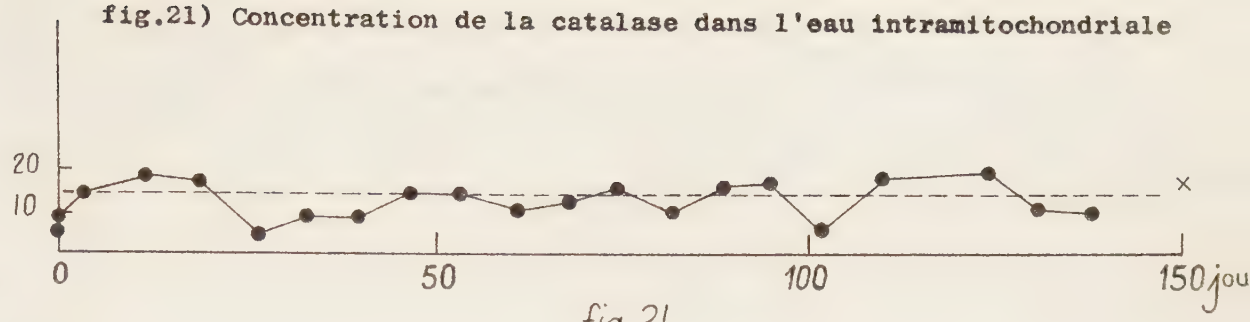


fig. 21

oncentration G / oncentration S

fig.22) Coefficient de distribution de la catalase entre les milieux liquides intra et extraparticulaires (conditions expérimentales décrites sur le tableau XIII).

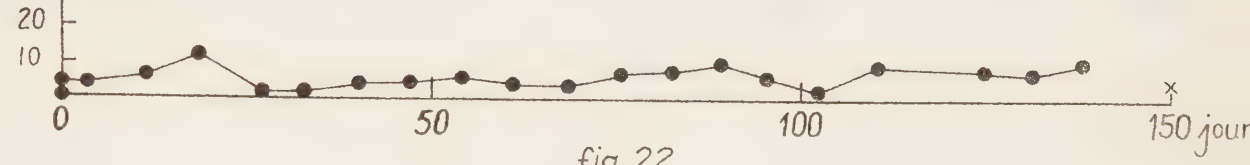


fig. 22

VII Catalase de la Fraction G

g. eau / gp. frais × 100

fig.23) Teneur en eau : déterminée sur un échantillon par la méthode de dessication.

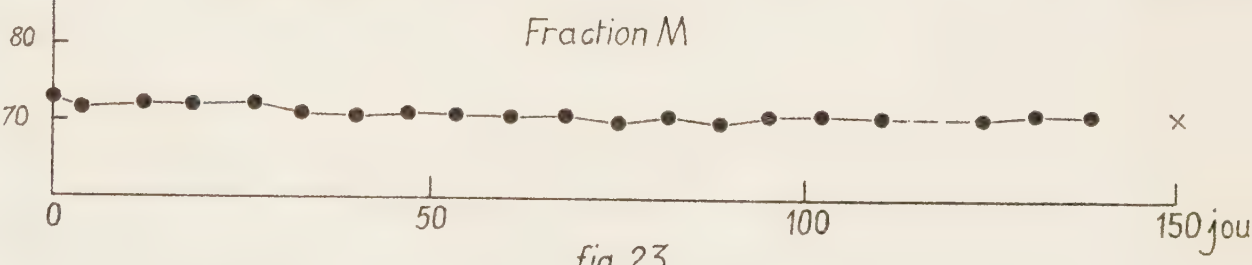


fig. 23

g. eau / gp. frais × 100

fig.24) Mêmes conditions expérimentales que sur la fig.23.

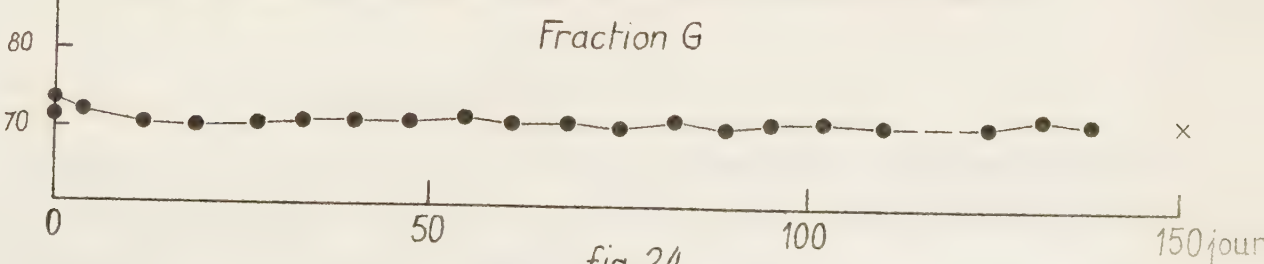


fig. 24

VIII Teneur en eau

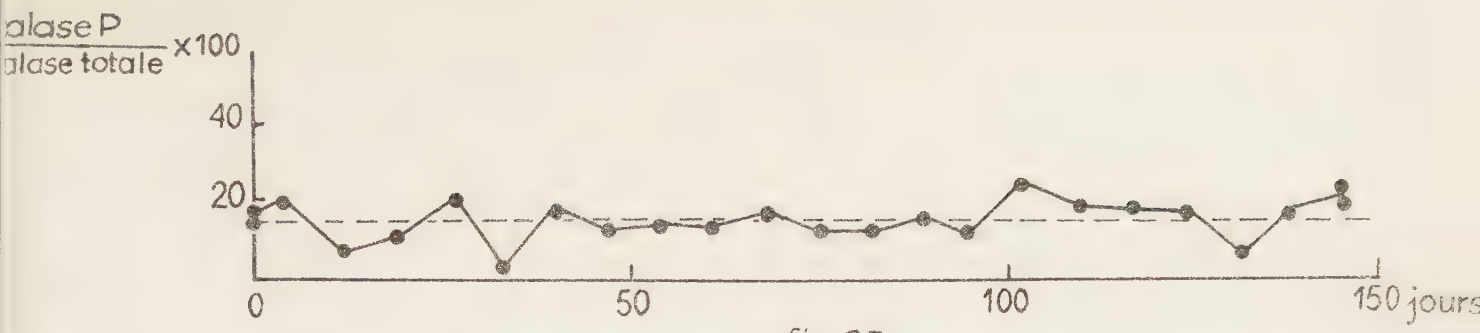


fig. 25

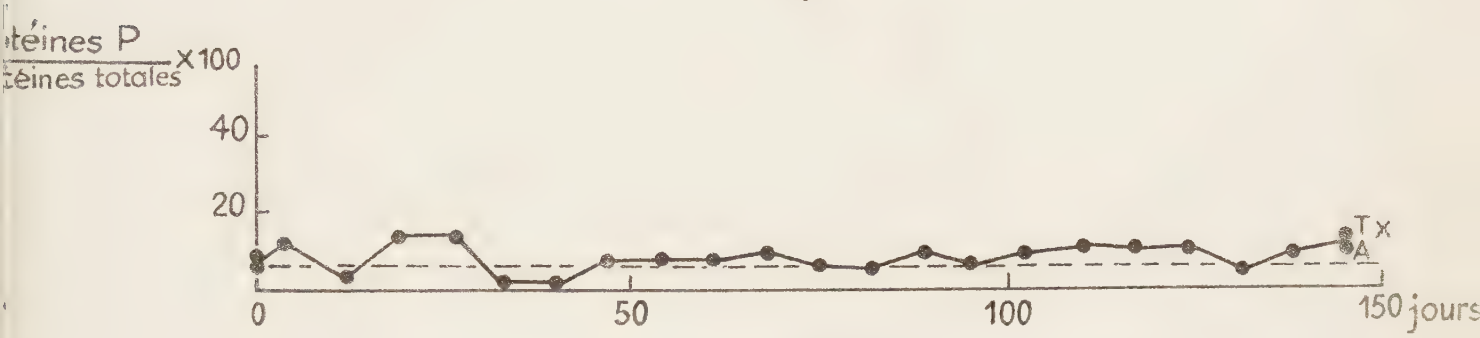


fig. 26

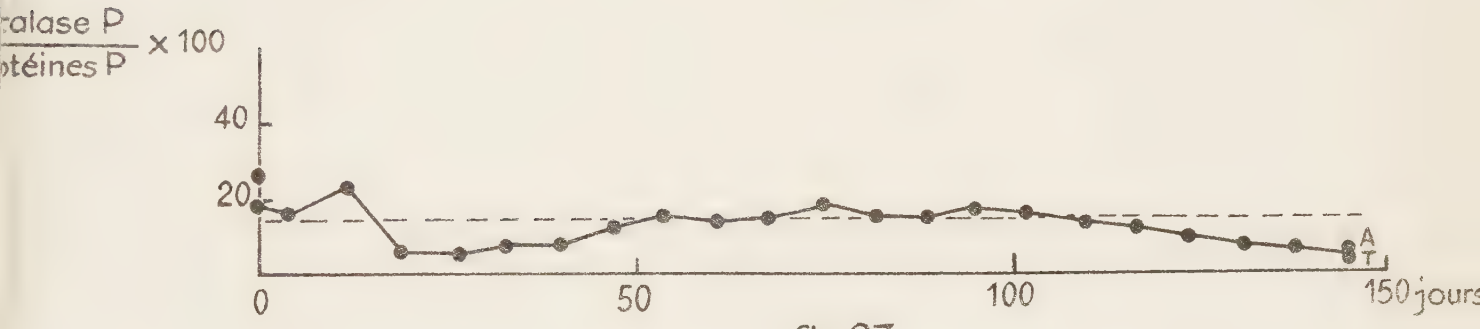


fig. 27

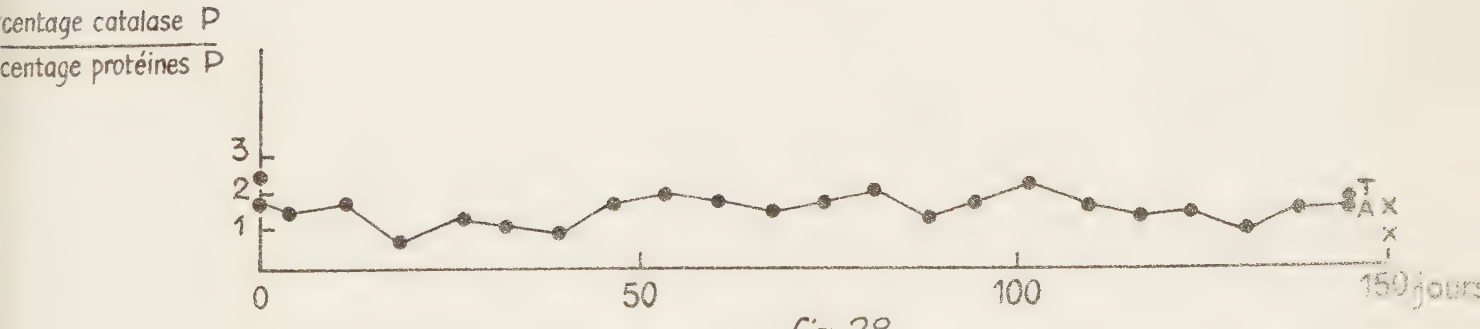


fig. 28

IX Catalase de la fraction P

fig.25) Pourcentage de la catalase de la fraction par rapport à la catalase totale.

fig.26) Pourcentage des protéines de la fraction par rapport aux protéines totales.

fig.27) Pourcentage de la catalase par rapport aux protéines.

fig.28) Concentration relative (voir fig.9)

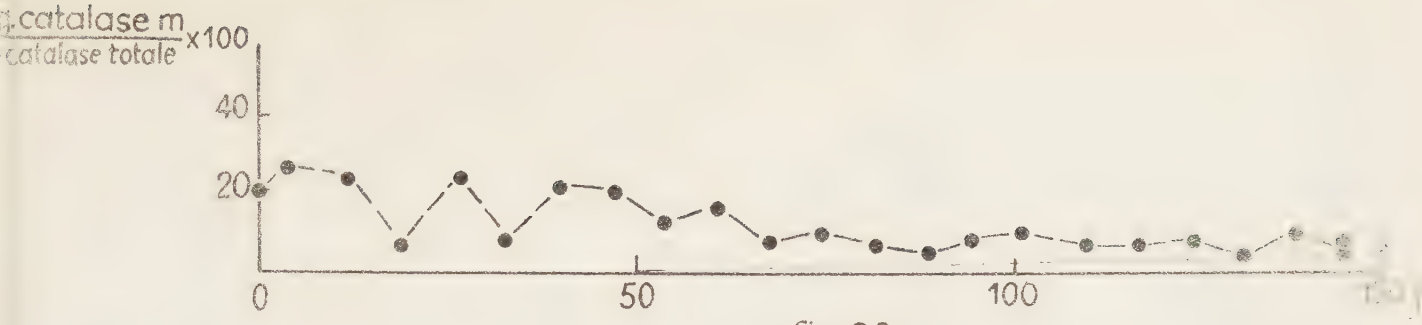


fig. 29

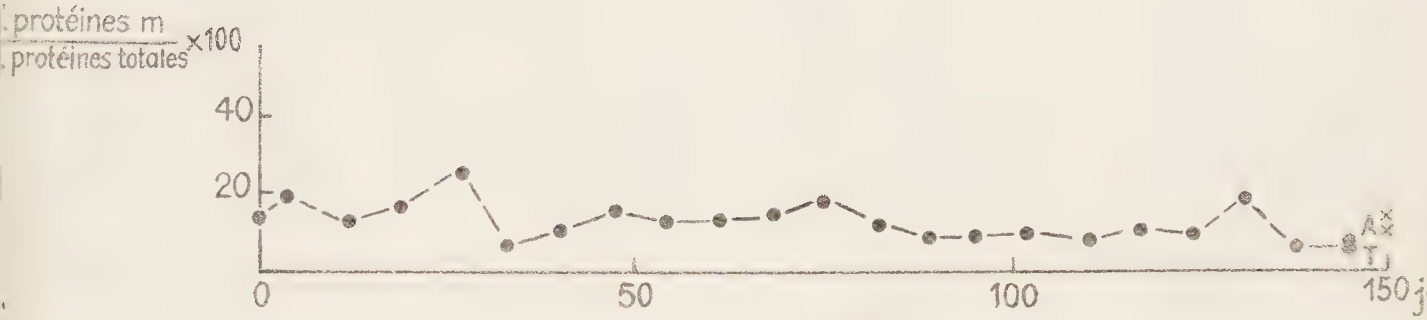


fig. 30

fig. 31

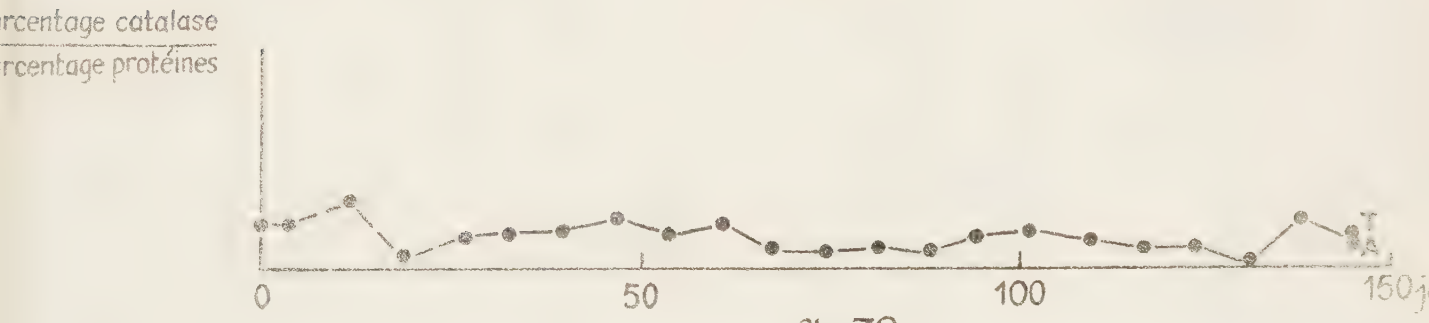


fig. 32

X Catalase de la fraction m

fig.29) Pourcentage de la catalase de la fraction par rapport à la catalase totale.

fig.30) Pourcentage des protéines de la fraction par rapport aux protéines totales.

fig.31) Pourcentage de la catalase par rapport aux protéines.

fig.32) Concentration relative (voir fig.9).

la catalase totale

Pourcentage des protéines totales

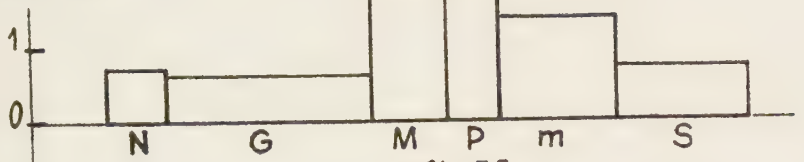


fig. 35
(0 jour)

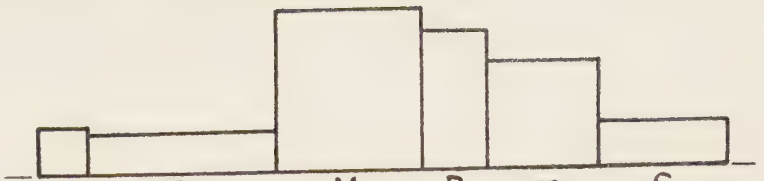


fig. 36
(0 jour)

fig. 37
(4 jours)

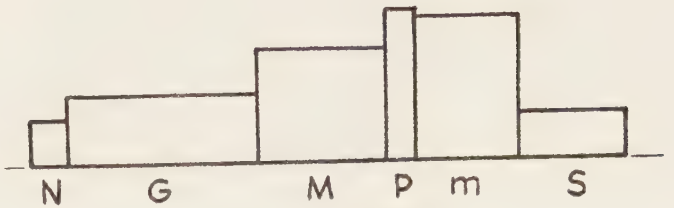


fig. 38
(11 jours)

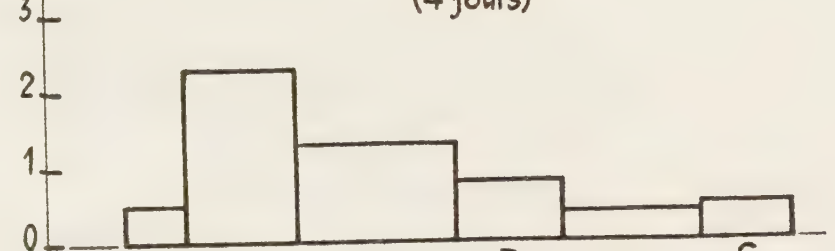


fig. 39
(19 jours)

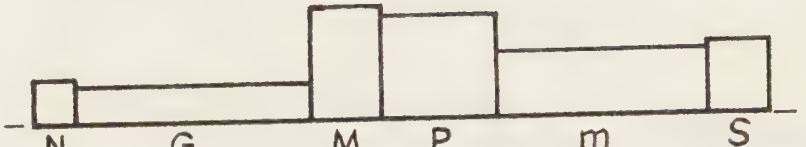


fig. 40
(27 jours)

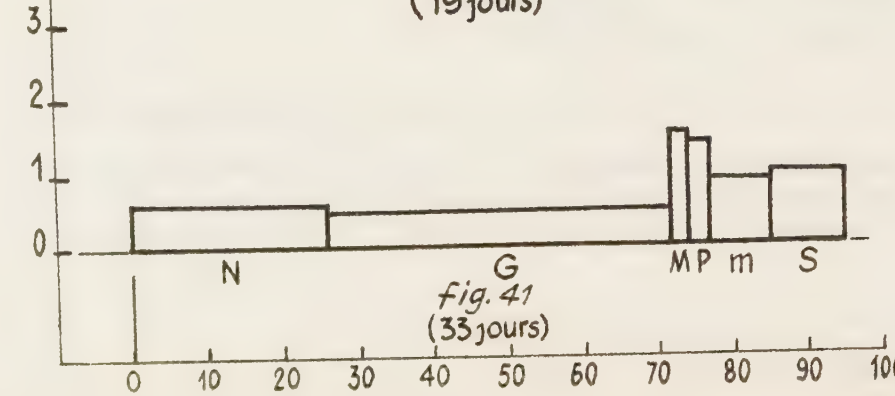


fig. 41
(33 jours)

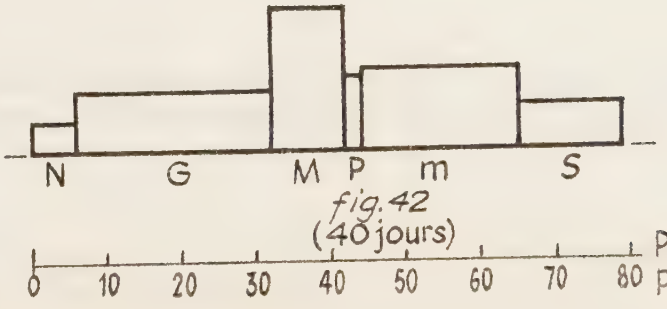


fig. 42
(40 jours)

Diagrammes de la distribution intracellulaire de la catalase au cours de la cancérisation —

la catalase totale
Pourcentage des protéines totales

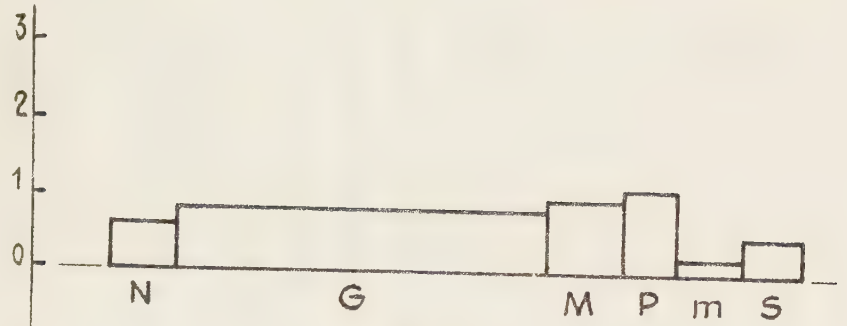


fig. 55
(131 jours)

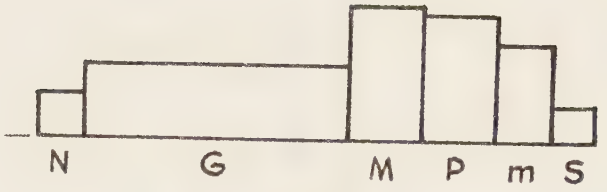


fig. 56
(138 jours)

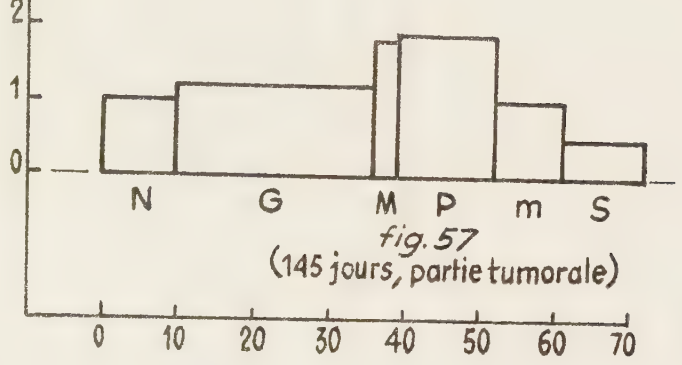


fig. 57
(145 jours, partie tumorale)

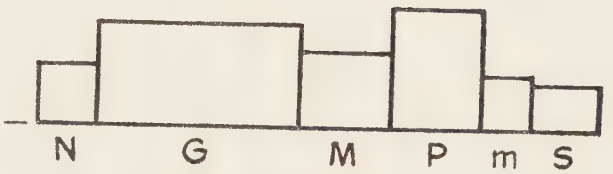
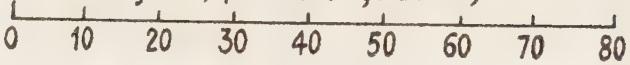


fig. 58
(145 jours, partie adjacente)



Diagrammes de la distribution intracellullaire de la catalase au cours de la cancèrisation

Ces diagrammes ont été inspirés par ceux de DE DUVE (35)

Pour chaque fraction, on porte en abscisse le pourcentage des protéines de la fraction par rapport aux protéines totales et en ordonnée le rapport du pourcentage de la catalase au pourcentage des protéines. On dispose les rectangles obtenus bout à bout sur l'axe des abscisses.

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

DU CHAPITRE III

Dans toutes nos expériences, nous avons dosé la catalase hépatique en nous basant sur une seule de ses activités : nous avons dosé la quantité d'eau oxygénée décomposée par les extraits actifs que nous avons préparés à partir des différentes fractions cellulaires. Nous avons donc déduit la concentration de la catalase à partir de cette seule activité enzymatique. Et nos résultats, qui sont des résultats quantitatifs, sont donc limités au seul cas où la catalase est munie de cette activité. Or, l'enzyme est susceptible d'être inactivé dans de multiples conditions. Ainsi, récemment, on a mis en évidence un mécanisme de photoinactivation de la catalase à la suite de son exposition à la lumière solaire (16). Pourtant, dans ce cas, on a vérifié qu'une seule des hématines de la molécule était détruite. Cette destruction partielle de la molécule n'en entraîne pas moins une inactivation totale de l'enzyme vis-à-vis de l'eau oxygénée. Or, dans un cas pareil, avec notre méthode de dosage, nous aurions trouvé que la catalase était inexistante. Cependant, nous avons pris soin de toujours maintenir nos préparations à l'abri de la lumière ; nous pensons donc avoir évité cette forme d'inactivation de l'enzyme. Nous l'avons citée comme exemple, pour montrer à quel point la méthode classique du dosage de la catalase par son action sur l'eau oxygénée est limitée.

De plus, il n'a pas encore été prouvé que l'activité "C" de la catalase, activité qui nous intéresse tout particulièrement, évoluait parallèlement à son activité "catalasique".

Il serait donc du plus haut intérêt de mettre au point une autre méthode de dosage de la catalase, en tant que molécule et non en tant qu'enzyme. Il serait également intéressant de déterminer la relation quantitative qui existe entre la concentration de la catalase et l'amplitude de la contraction des mitochondries qu'elle provoque, comme cela a déjà été fait pour le facteur "C" global (composé de ses trois constituants moléculaires (93).

De plus, nous avons toujours dosé la catalase, contenue dans nos préparations, en présence d'éthanol qui protège l'enzyme d'une inactivation partielle par l'eau oxygénée formée à l'air par autoxydation (formation du complexe II de CHANCE (25)). Mais, si ce même mécanisme d'inactivation s'était également produit in vivo, au cours du métabolisme, par un processus normal ou pathologique, cette inactivation serait passée inaperçue par notre méthode de dosage. Cependant on a déjà vérifié que l'éthanol ne supprime pas l'inhibition de la catalase chez des animaux porteurs de tumeur (10).

Enfin, nous avons étudié, au cours de la cancérisation, la localisation de la catalase, et sa distribution intracellulaire sur des fractions assez arbitrairement séparées. Durant ce processus, en effet, nous avons fractionné la cellule hépatique par la méthode utilisée pour un foie de rat normal.

Compte tenu de ces restrictions, nous pensons avoir obtenu quelques résultats significatifs.

Nous avons, en effet, observé une stabilité remarquable de la catalase à tous les niveaux de la cellule. Toutefois, quelques perturbations se sont manifestées et seraient donc à étudier de plus près. Ainsi, le trente-troisième jour d'administration du régime cancérigène est-il marqué par une anomalie du comportement de toutes les particules subcellulaires à la centrifugation. En effet, la première centrifugation, quoique très

faible, a provoqué une sédimentation en masse de tous les éléments particulaires, sans doute par suite d'une viscosité accrue du milieu de fractionnement. Pourtant, à ce stade, le foie paraît encore normal : le rapport pondéral de l'organe à l'animal, sa teneur en protéines, restent inchangés (toutefois, le degré d'hydratation du foie est plus élevé) et, surtout, la richesse du foie en catalase est normale. Pourtant, la fraction cytoplasmique soluble, à ce moment, est enrichie en catalase par rapport à la catalase totale du foie entier. Mais en même temps, la concentration de la catalase dans l'eau du cytoplasme reste aussi normale. De plus, deux des trois fractions mitochondriales (M. et P.) sont très appauvries en catalase et en protéines. Le coefficient de distribution de la catalase, entre les milieux liquides intra et extraparticulaires, est faible. Il nous faut toutefois insister sur le fait que ces anomalies peuvent aussi être le résultat d'un comportement inhabituel des particules à la centrifugation, effectuée de manière identique tout au long de cette étude.

Or, en étudiant une cancérisation du foie de rat induite par un autre cancérigène, le 3'méthyl-4-diméthylaminoazobenzène ARCOS a également mis en évidence une période critique au même stade de la cancérisation (quatrième semaine de régime cancérigène) (15). Il a remarqué que les mitochondries présentaient alors de multiples anomalies : une aptitude minima au gonflement induit par de nombreuses substances et, en même temps, une teneur très diminuée en protéines, en acides ribonucléiques et en riboflavines. Il a également remarqué que le nombre même des mitochondries avait considérablement diminué (nous avons justement constaté un fait analogue avec les particules "M" et "P"). Peut-être existe-t-il un parallélisme entre ces deux cancérisations du foie induites par des agents tout à fait différents ?

Une autre anomalie se manifeste les 54ème et 61ème jours d'administration du régime cancérigène : la catalase, à ce moment, est anormalement concentrée dans l'eau intramitochondriale (mitochondries "M") et son coefficient de distribution entre les milieux liquides intra et extraparticulaires a une valeur très supérieure à la valeur moyenne trouvée dans les autres expériences.

A l'exception de ces deux stades, le taux de la catalase paraît rester inchangé à tous les niveaux cellulaires, jusqu'à la fin de la cancérisation et la catalase reste présente même lorsque l'hépatome est formé.

Ainsi, le foie reste-t-il toujours très riche en catalase, tout au long de la cancérisation, à l'exception des derniers jours (130ème jour d'administration de diéthylnitrosamine). A ce moment, la tumeur est déjà formée. Mais cette baisse finale de la teneur du foie en catalase peut alors être simplement expliquée par une carence générale provoquée par la tumeur. Peut-être est-il permis de penser que l'activité de la catalase qui dépend de cette richesse reste-t-elle inaltérée tout au long du processus ?

Nous n'avons pas remarqué une migration significative de la catalase à l'intérieur de la cellule hépatique durant le déroulement de la cancérisation. Mais il nous faut tenir compte de la pureté très relative des fractions sur lesquelles nous l'avons étudiée. Ces résultats iraient à l'encontre de ceux cités par certains auteurs (2).

Ainsi, tout semble indiquer que la catalase, contrairement à ce qui a été affirmé (24), n'est pas modifiée au cours du processus de cancérisation. Or, nous l'avons étudiée en utilisant un cancérigène particulièrement efficace et spécifique du foie et qui, de plus, agit dans des conditions de nutrition absolument normales.

Enfin, nous avons trouvé que la concentration de la catalase dans le cytoplasme (rapportée à l'eau de ce dernier) n'avait pas varié. Ce résultat signifierait que l'un des trois constituants du facteur C n'a pas subi de modifications. Nous voyons ainsi qu'un facteur très important du maintien de la structure des mitochondries semble inaltéré. Si l'on tient compte du lien étroit qui existe entre la structure de ces dernières et leur activité métabolique, nos résultats pourraient être un argument pour affirmer que les mitochondries ne joueraient pas de rôle dans le développement d'une tumeur.

CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALES

Nous nous étions proposé, au cours de ce travail, de vérifier que les mitochondries participaient au processus de cancérisation. Or, il était déjà connu que certaines altérations de la membrane mitochondriale pouvaient être à l'origine des déviations métaboliques spécifiques du tissu tumoral (15). Ce problème nous a amenée à nous intéresser à un enzyme, la catalase hépatique, dont le rôle dans la régulation structurale et métabolique des mitochondries est établi.

On a longtemps considéré que la catalase était localisée dans les mitochondries (48) ; il est aussi admis qu'elle participe aux oxydations phosphorylantes et au couplage de la chaine respiratoire (27 , 88). La catalase joue également un rôle important dans le contrôle de la structure des mitochondries et particulièrement dans leur maintien à l'état contracté (94). Or, certains auteurs ont montré que la catalase hépatique disparaissait pendant le développement d'une tumeur (53, 54, 52, 20).

Pour toutes ces raisons, nos recherches ont porté simultanément sur les mitochondries et sur la catalase, dans le foie de rat.

Nous avons commencé par effectuer une étude préliminaire de certaines propriétés des mitochondries liées à l'état de leur membrane. Parallèlement, nous avons examiné la localisation intracellulaire de la catalase et son évolution au cours d'une cancérisation expérimentale du foie induite par un cancérigène nouveau, particulièrement puissant, efficace, et préférentiel pour le foie : la diéthylnitrosamine. Nous avons également étudié la perméabilité des mitochondries à la catalase.

Nos premières investigations ont porté sur le foie de rat normal. Nous avons séparé deux classes de mitochondries qui diffèrent par leur vitesse de sédimentation, et nous les avons

caractérisées par leurs propriétés oxydophosphorylantes et membranaires.

Nous avons ainsi préparé une fraction constituée par des mitochondries "lourdes", nettement prépondérantes dans le foie d'un animal normal, adulte. Leur pureté et leur intégrité ont été vérifiées par microscopie électronique et ces résultats concordent avec la valeur satisfaisante trouvée pour leur rapport P/O des oxydations phosphorylantes. Cependant, nous ne sommes pas parvenue à séparer entièrement les mitochondries légères des particules submitochondriales, lysosomes, "microbodies", microsomes.

Les mitochondries lourdes ont une composition stable en ARN et en protéines, elles s'avèrent être à la fois plus gonflées et plus réactives aux agents du gonflement mitochondrial. Elles sont moins riches en catalase que les mitochondries légères, mais, en même temps, leur contraction, en présence d'ATP, est plus rapide et plus complète en présence de catalase exogène que celle des mitochondries légères. Par contre, nous n'avons pas constaté avec ces mitochondries lourdes, et en utilisant le succinate comme substrat d'oxydation, une participation directe de la catalase aux oxydations phosphorylantes, participation à laquelle le cytochrome serait lié (88).

La composition en ARN et en protéines des mitochondries légères reste très variable d'une préparation à l'autre. Cette fraction de mitochondries légères perd son pouvoir oxydophosphorylant lorsqu'une purification partielle l'appauvrit en certains éléments plus petits que les mitochondries, principalement peut-être, les "microbodies" qui sont particulièrement riches en catalase (14). Ces mitochondries légères présentent une aptitude remarquable à accumuler activement le phosphate et le calcium au moyen de l'énergie fournie par l'oxydation du succinate. Elles assurent de la sorte l'homéostase ionique du milieu intracellulaire, et participent au transport actif intracellulaire (82 , 103) et même transcellulaire (102).

Nous avons ainsi montré que ces deux classes de particules diffèrent entre elles de façon significative. Ces résultats permettent d'étayer une hypothèse selon laquelle les mitochondries lourdes seraient physiologiquement plus âgées que les mitochondries légères. Les premières correspondraient à une étape plus avancée du renouvellement mitochondrial qui se produit in vivo (44 , 46), sous l'influence simultanée des différents agents de gonflement et de contraction présents dans le milieu liquide intracellulaire, principalement du glutathion et de la catalase qui ont une action antagoniste dans ce processus (83, 94).

Certains auteurs considèrent que les "microbodies", particules les plus riches en catalase (18), sont, in vivo, les précurseurs des mitochondries (104). Si l'on admet cette hypothèse, on peut proposer le schéma suivant, représentant partiellement l'évolution suivie par les mitochondries : "microbodies" ——→ mitochondries légères ——→ mitochondries lourdes. Ce schéma sommaire comporterait également toutes les étapes intermédiaires de cette transformation graduelle des particules. En effet, celles-ci, au fur et à mesure de leur évolution, subissent un appauvrissement progressif en catalase et présentent ainsi une résistance au gonflement qui va en diminuant pour aboutir finalement à leur destruction par éclatement, au moment où le rôle protecteur de leur catalase interne a disparu.

On peut facilement admettre qu'un organe aussi complexe et aussi différencié que le foie, contient simultanément ces différents types de particules, "microbodies", mitochondries légères, et lourdes, dérivant les unes des autres, munies de fonctions différentes, et cependant mutuellement dépendantes. Ainsi l'homéostase ionique, assurée principalement par les mitochondries légères, préserve l'activité enzymatique des mitochondries lourdes et, plus particulièrement, leurs

oxydations phosphorylantes, par exemple en soustrayant du milieu intracellulaire le calcium qui est un agent découplant (75). Nous avons proposé, de la sorte, dans notre travail, un schéma qui représente une partie du cycle du renouvellement mitochondrial et nous signalons que la catalase est susceptible de jouer un rôle fondamental dans ce processus.

L'étude de la distribution intracellulaire de la catalase hépatique nous a montré que cet enzyme se concentrait dans la fraction des mitochondries légères. Les résultats relatifs à cette localisation présentent toutefois une certaine dispersion. Ce fait s'explique aisément si l'on tient compte des données suivantes :

I - de DUVE et coll. (18) ont montré que la catalase est localisée dans les "microbodies" que notre technique de centrifugation différentielle ne permet pas d'isoler, et qui pourraient, de ce fait, se retrouver en quantité variable dans toutes les fractions cellulaires que nous avons séparées.

II - HIGASHI et coll. (60) ont isolé, à partir de mitochondries de foie de rat préparées, comme dans nos propres expériences, dans une solution de saccharose isotonique en présence de polyvinylpyrrolidone, quatre catalases distinctes, différant entre elles par leur comportement chromatographique et par leur mobilité électrophorétique.

III - PRICE et coll. (97) ont identifié, par ailleurs, deux catalases distinctes : la synthèse de l'une est bloquée par l' allylisopropyl-acétamide, tandis que la synthèse de l'autre n'est pas affectée.

IV - Enfin, DAVIDOVA et coll. (33) ont mis en évidence, toujours dans le foie de rat, l'existence de deux catalases distinctes : l'une est hydrosoluble, l'autre, liée aux lipoprotéines. En outre, dans ce dernier cas, le traitement d'un

homogénat de foie par les détergents, ne libère que partiellement ce dernier type de catalase ; or, ceci pourrait être précisément le cas dans nos expériences où nous avons extrait la catalase contenue dans les différentes fractions cellulaires en utilisant le TRITON X-100.

Le problème de la localisation intracellulaire de la catalase semble ainsi lié à celui de la nature moléculaire précise de l'enzyme, qui pourrait exister sous forme de plusieurs isoenzymes différents.

En suivant l'évolution de la catalase hépatique au cours d'une cancérisation du foie de rat induite par la diéthylnitrosamine , nous avons établi, par des observations macro- et microscopiques, que le temps de latence qui s'écoule entre le début de l'administration du cancérigène et la formation de la tumeur était de cinq semaines. Or, au bout de quatre semaines, nous avons observé que le foie présentait de multiples anomalies et, en particulier, un comportement anormal de l'homogénat à la centrifugation différentielle.

A ce stade, le foie est nettement appauvri en mitochondries ; celles-ci, toutefois, gardent une teneur normale en catalase. Cependant, le cytoplasme est en même temps enrichi en eau et en catalase : ces deux variations simultanées ont pour effet de maintenir constante la concentration de la catalase dans le milieu liquide cytoplasmique. Enfin, pendant ce temps de latence, la fraction microsomiale est riche en catalase, peut-être, par suite d'une contamination de cette fraction par les "microbodies"

Pendant la huitième semaine de cancérisation, la catalase se concentre de manière anormale dans les mitochondries légères.

Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une période critique pendant la cancérisation. Or, une période

critique semblable a été trouvée par ARCOS et coll. (15) au même stade du processus, au cours d'une cancérisation provoquée par l'ingestion du 3'méthyl-4bis-diméthylaminoazobenzène . Ceci nous permet d'admettre qu'il existe un parallélisme dans le développement d'un hépatome induit par deux agents tout à fait différents.

Nous avons mis, de la sorte, en évidence l'existence de plusieurs étapes significatives dans le développement de la tumeur, étapes qui doivent être l'objet de recherches plus poussées.

Nous avons trouvé que le taux du foie entier en catalase restait stable et, plus particulièrement, que la concentration de la catalase dans le cytoplasme était maintenue constante de façon significative. Le foie reste ainsi toujours riche en catalase et ceci nous permet d'admettre que la fonction de la catalase qui lui est associée n'est pas altérée pendant le processus. Ces derniers résultats signifient également que ce facteur important du contrôle de la structure de la membrane mitochondriale reste inchangé pendant le développement de l'hépatome.

Dans l'hépatome solide que nous avons finalement obtenu, nous avons remarqué que la catalase est toujours présente, quoique ayant diminué les derniers jours du processus. L'enzyme se concentre alors davantage dans la fraction des mitochondries légères, mais semble en même temps avoir diffusé dans toutes les fractions cellulaires, soit par suite d'une fragilité accrue des différentes particules que nous avons séparées par centrifugation différentielle, soit par suite d'une dédifférenciation subie par les différents éléments figurés du cytoplasme pendant le développement de la tumeur.

Nous avons trouvé que des mitochondries provenant de cellules purement tumorales (hépatome ascitique de ZAJDELA)

avaient un site de phosphorylation découplé. Or, HAWTREY et coll. (58) ont montré que ce découplage se produisait au 3ème site, entre le cytochrome C et l'oxygène. D'autre part, la teneur en cytochrome c de ces mêmes mitochondries est particulièrement élevée dans certaines tumeurs (26). Ces deux constatations nous paraissent justifier des recherches supplémentaires.

Le rôle véritable de la catalase dans la cellule reste toujours à préciser. Son activité peroxydasique est bien établie (116, 70, 72) ; cette activité a une spécificité plus large qu'on ne le pensait initialement (66 , 8). La catalase intervient aussi dans certains mécanismes enzymatiques tels que la libération de l'iode par la l-thyroxine (89). Cependant, on a vérifié tout récemment que, au niveau des mitochondries, la catalase ne participait pas à la réaction terminale de la cytochrome-oxydase (69). Mais on sait aussi que la catalase a une action de nature non enzymatique sur les propriétés de la membrane mitochondriale (94). Or, nous avons montré que <u>la catalase, par cette fonction précisément, joue un rôle de base dans le processus du renouvellement mitochondrial</u>.

Il existe plusieurs moyens de poursuivre l'étude de la catalase, en relation avec les mitochondries. Nous citerons deux exemples :

1 - L'étude d'un métabolisme aberrant, qui se manifeste au cours d'un état pathologique, a souvent permis de préciser le métabolisme normal correspondant. Ainsi, la <u>thyrotoxicose</u> est caractérisée en même temps par une perturbation de la catalase hépatique (116) et par une altération morphologique des mitochondries du foie (47). Cette affection est considérée comme un cas de "maladie mitochondriale" (61).

2 - Nous avons montré la nécessité d'apporter des modifications au procédé de fractionnement de la cellule hépatique

à chaque étape de la cancérisation. Cette étude systématique devrait permettre de mettre en évidence la formation de mitochondries "aberrantes" ou dédifférenciées, pendant le développement d'une tumeur.

Nous espérons que les informations que nous avons apportées contribuent à préciser la relation certaine qui existe entre la catalase et les mitochondries.

B I B L I O G R A P H I E

1 - ADAMS D.H.
1950.Brit.J. of Canc. 4,183.

2 - ADAMS D.H.
1959. Acta Unio Intern. c. Cancr.. 15,855.

3 - ADAMS D.H.
1959. Brit.J. of Canc. 13. 704.

4 - ADAMS D.H.
1960. Biochem. J. 74,144.

5 - ADAMS D.H., BERRY M.E.
1956. Biochem. J. 64,492.

6 - ADAMS D.H., BURGESS E.A.
1957. Brit. J. of Canc. 11, 310.

7 - ADAMS D.H., BURGESS E.A.
1959. Biochem. J. 71, 340.

8 - AEBI H.
1960. Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 187.

9 - AISENBERG A.C., MORRIS H.P.
1963. Canc. Res. 23, 566.

10 - ALEXANDER N.M.
1957. J. Biol. Chem. 227, 975.

11 - ALLARD C., LAMIRANDE G. de , CANTERO A.
1957. Canc. Res. 17, 862.

12 - AMOORE J.E., BARTLEY W.
1958. Biochem. J. 69, 223.

13 - ANDREJEV A., ROSENBERG A.J.
1956. C.R. Soc. Biol. 150, 1855.

14 - ARCOS J.C., GOSH H.H., ZICKAFOOSE D.
1961. J. Biophys. Biodhem. Cyt. 10, 23.

15 - ARCOS J.C., GRIFFITH G.W., CUNNINGHAM R.W.
1960. J. Biophys. Biochem. Cyt. 7, 49

16 - ARONOFF S.
1965. Science 150, 72.

17 - AVI-DOR Y.A.
1960. Biochim. Biophys. Acta 39, 53.

18 - BEAUFAY H., BERTHET J.
1963. Biochem. Soc. Symp. 23, 66 (Cambridge Univ.Press)

19 - BEERS R.E., SIZER I.W.
1952. J. Biol. Chem. 195, 133.

20 - BEGG R.W., DICKINSON T.E.
1951. Canc. Res. 11, 409

21 - BOXER G.E., DEVLIN T.M.
1961. Science 134, 1495.

22 - BUSCH H.
1962. An Introduction to the Biochemistry of the Cancer Cell. p. 241. (Acad. Press. N.Y.)

23 - BUSCH H., STARBUCK W.C.
1964. Ann. Rev. of Biochem. 33.

24 - CERIOTTI G., SPANDRIO L., AGARDI A.
1958. Biochim. Biophys. Acta 27, 432.

25 - CHANCE B.
1950. Biochem. J. 46, 387.

26 - CHANCE B., CASTOR L.N.
1952. Science, 200, 116.

27 - CHANCE B., WILLIAMS G.R.
1956. Adv. in Enzymology 17, 65 (Inters. Publ. N.Y.)

28 - CLERICI E., CUPKOWICZ G.
1956. J. Natl. Canc. Inst. 16, 1459.

29 - COHEN P.P.
1959. in "Manometric Techniques", p. 147, 3e éd. (Burgess P. Minneapolis).

30 - COOPER C., LEHNINGER A.L.
1957. J. Biol. Chem. 224, 547.

31 - COPENHAVER J.H. , LARDY H.A.
1952. J. Biol. Chem. 195, 222.

32 - CORWIN M.
1959. J. Biol. Chem. 234, 2.448.

33 - DAVIDOVA S. et coll.
1966. Vopr. Med. Khim. 12, 2.

34 - DAY E.D., GABRIELSON F.C., LIPKIND J.B.
1954. J. Natl. Canc. Inst. 15, 239.

35 - DE DUVE C.
1960. Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 11.

36 - DE DUVE C.
1963. J. Théorit. Biol. 6, 33.

37 - DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R., APPELMANS F.
1955. Biochem. J., 60, 604.

38 - DRUCKREY H., SCHMAHL D., SCHILDBACH A.
1961. Naturwiss. 48, 56.

39 - DRUCKREY H., STEINHOF D.
1962. Naturwiss. 49, 497.

40 - EMMELOT P.
1957. Chew. Weekblad. 53, 255.

41 - EULER H. von, HELLER L.
1949. Z. Krebsforsch , 393, 1949.

42 - FEINSTEIN R.N.
1950. Science. 111, 149.

43 - FISZER B.
1964. Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 403.

44 - FLETCHER M.J., SANADI R.
1961. Biochim. Biophys. Acta 51, 356.

45 - FOURCADE A., ROSENBERG A.J.
1962. Bull. Soc. Chim. Biol. 44, 471.

46 - FOURCADE A., SZAFARZ D., RUET A.
1963. Bull. Soc. Chim. Biol. 45, 951.

47 - GREENAWALT J.W., FORSTER
1964. in "the Mitochondrion" p. 37 (W.A. Benj. Inc. N.Y.)

48 - GREENFIELD R.E., PRICE V.E.
1954. J. Biol. Chem. 209, 363.

49 - GREENFIELD R.E., PRICE V.E.
1956. J. Biol. Chem. 220, 607.

50 - GREENGARD P., MINNAERT K., SLATER E.C., BETEL I.
1959. Biochem. J. 73, 637.

51 - GREENSTEIN J.P.
1943 - J. Natl. Canc. Inst. 3, 397.

52 - GREENSTEIN J.P.
1943. J. Natl Canc. Inst. 4, 283.

53 - GREENSTEIN J.P.
1954. Biochemistry of Cancer (Acad. Press. N.Y.)

54 - GREENSTEIN J.P., ANDERWONT H.B.
1942. J. Natl. Canc. Inst. 2, 345.

55 - GREENSTEIN J.P., JENRETTE W.V., WHITE J.
1941. J. Natl. Canc. Inst. 2, 283.

56 - GIRKIN G., KAMPSCHMIDT R.F.
1960. Endocrinol. 67, 839.

57 - HATEFY Y., LESTER R.L.
1958. Biochim. Biophys. Acta 27, 83.

58 - HAWTREY A.O., SILK M.H.
1960. Biochem. J. 74, 21.

59 - HIGASHI T., PETERS T. Jr.
1963. J. Biol. Chem. 238, 3.945.

60 - HIGASHI T., SHIBATA Y.
1965. J. Biochem. (Japan) 58, 6, 530.

61 - HOCH F.L.
1962. J. Med. 266, 446.

62 - HOGEBOOM G.H., SCHNEIDER W.C.
1955 in "The Nucleic Acids, II, p. 199 (Acad.Press.N.Y.)

63 - HUNTER F.E. Jr.
1955. in "Methods in Enzymology" II, p. 610 (Acad. Press. N.Y.)

64 - HUNTER F.E., FORD L.
1955. J. Biol. Chem. 216, 357.

65 - JACOBS E.E., SANADI D.R.
1960. J. Biol. Chem. 235, 531.

66 - KEILIN D., HARTREE E.F.
1936. Proc. Roy. Soc. 119, 141.

67 - KIELLY R.K.
1952. Canc. Res. 12, 124.

68 - KLINGENBERG M., SCHOLLMEYER P.
1961. Biochem. Z. 333, 338.

69 - KRASNA A.I.
1965. Arch. Biochem. Biophys. 112 (1) 209.

70 - KUCHINSKAS E.J.
1965. Arch. Biochem. Biophys. 112 (3) 610.

71 - LACASSAGNE A., HURST L., ROSENBERG A.J.
1960. C.R. Acad. Sci. 251, 1053.

72 - LADU B.N., ZANNONI V.G.
1956, Nature, 177, 574.

73 - LARDY H.A., WELLMAN H.
1952. J. Biol. Chem. 195, 215.

74 - LEBRETON E., MOULÉ Y.
1961. in "The Cell", V p. 497 (Acad. Press. N.Y.)

75 - LEHNINGER A.L.
1949. J. Biol. Chem. 178, 625.

76 - LEHNINGER A.L.
1959. J. Biol. Chem. 234, 2.465.

77 - LEHNINGER A.L.
1962. J. Biol. Chem. 237, 946.

78 - LEHNINGER A.L.
1962. Physiol. Rev. 42, 467.

79 - LEHNINGER A.L.
1964. in "The Mitochondrion", p. 199 (W.A. Benj. Inc. N.Y.)

80 - LEHNINGER A.L., NEUBERT D.
1961. Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 129.

81 - LEHNINGER A.L., RAY B.L., SCHNEIDER M.
1959. J. Biophys. Biochem. Cyt. 5, 97.

82 - LEHNINGER A.L., ROSSI C., GREENAWALT J.W.
1963. Biophys. Biochem. Res. Comm. 10, 444.

83 - LEHNINGER A.L. , SCHNEIDER M.
1959. J. Biophys. Biochem. Cyt. 5, 109.

84 - MACHEBOEUF M. , DELSAL J.
1943. Bull. Soc. Chim. Biol. 25, 116.

85 - MAGEE P.N., LEE K.Y.
1964. Biochem. J. 91, 35.

86 - MALAMED S. et RECKNAGEL R.O.
1959. J. Biol. Chem. 234, 3.027.

87 - MANOÏLOV S.E., KHANSON K.P.
1964. Vopr. Med. Khim. 10, 411.

88 - MANOÏLOV S.E. , VOVSI B.A., DMITRIEVA A., POLOSOVA P.G
1965. Vopr. Med. Khim. 11, 100.

89 - MANTE S., CARTOUZOU G., LISSITSKY S.
1965. Bull. Soc. Chim. Biol. 47 , 1079.

90 - MASON E.E., CHIN T.F., LI Y.V. , ZIFFREN S.E.
1960, Canc. Res. 20, 1474.

91 - MILLER J.A., MILLER E.C.
1965. Ann. of the N.Y. Acad. of Sci. 123, 125.

92 - MUTOLO V.M., AGRIGNANI F.
1957. Brit. J. Canc. 11, 590.

93 - NEUBERT D., ROSE T.H., LEHNINGER A.L.
1962. J. Biol. Chem. 237, 2.025.

94 - NEUBERT D., WOJTCZAK A.B., LEHNINGER A.L.
1962. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 1651.

95 - NOVIKOFF A.B.
1955. Proc. of The third Internat. Congr. of Biochem. Brussels, 315.

96 - POTTER V.R.
1959. in "Manometric Techniques", p. 180,3e éd. (Burgess Publ. Minneapolis).

97 - PRICE V.E., STERLING W.R., TARANTOLA V.A., HARTLEY R.W.Jr, RECHCIGL M., Jr.
1962. J. Biol. Chem. 237, 3.468.

98 - RAAFLAUB J.
1953. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 11, 142.

99 - RACKER E.
1961. Adv. in Enzymol. 23, 323.

100 - RAVICOVITCH R.
1964. Thèse de Doctorat, Paris.

101 - RECHCIGL M. Jr., PRICE V.E.
1961. Experimentia 17, 258.

102 - RHODIN J.
1954. Karolinska Inst. Stockholm.

103 - ROSSI C.S., LEHNINGER A.L.
1963. Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 441.

104 - ROUILLER C.
1960. Internat. Rev. of Cyt. 9, 227 (Acad.Press. N.Y.)

105 - ROUILLER C. , BERNHARD W.
1956. J. of Biophys. Biochem. Cyt. 2, 355.

106 - SACKTOR B.
1953. J. Gen. Physiol. 37 , 343.

107 - SCHMAHL D., PREUSSMAN R., HAMPERL H.
1960. Naturwiss. 47, 89 .

108 - SCHNEIDER W.C.
1959. in "Manometric Techniques", 3e éd. p. 192 (Burgess p. Minneapolis).

109 - SCHNEIDER W.C. , HOGEBOOM G.H.
1952. J. Biol. Chem. 197, 118.

110 - SCHULTZE H., LOW H., ERNSTER L., SJOSTRAND F.S., Electron Microscopy Proc. Stockholm Conference (Acad. Press. N.Y.) p. 134.

111 - SCHWEITZER
1950.

112 - STADIE W.C. , RIGGS B.C.
1944. J. Biol. Chem. 154, 687.

113 - TAPLEY D.F.
1956. J. Biol. Chem. 222, 325.

114 - TEDESCHI H., HARRIS D.L.
1955. Arch. Biochem. 58, 52.

115 - VASINGTON F.D. , MURPHY J.V.
1962. J. Biol. Chem., 237, 2.670.

116 - VENKATARAMAN S., SREENIVASAN A.
1966. Enzymologia 30 (2) 91

117 - VOGEL A.I.
1948. J. Chem. Soc. London, 1846.

118 - WARBURG O.
1956. Science, 123, 309.

119 - WEIL - MALHERBE H. , SCHADE R.
1948. Biochem. J., 43, 118.

120 - WEINHOUSE S.
1955. Adv. in Canc. Res. 3, 269.

121 - WERKHEISER W.C. , BARTLEY W.
1957. Biochem. J. 66, 79.

122 - WILLIAMS M.L.
1961. Biochim. Biophys. Acta 47, 411.

123 - WILLIAMS - ASHMAN H.G. , KENNEDY E.P.
1952. Canc. Res. 12, 415.

124 - WOODS M.W. , DU BUY H.G.
1951. J. Natl. Canc. Inst. 11, 1.105.

125 - YAGI K., MATSUOKA Y., KHOUVINE Y.
1957. Bull. Soc. Chim. Biol. 39, 1.243.

126 - ZAJDELA F.
1963. Colloque Franco-Soviétique (Ed. Gauthier-Villard).

127 - SCHWEITZER G.K., STEIN B.A., 1950, Nucleonics, 7 (3), 65.

D E U X I E M E T H E S E

Propositions données par la Faculté

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

SUR LES CATALASES

Vu et approuvé,
Orsay , le 22 novembre 1966

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J . BERGERARD

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE